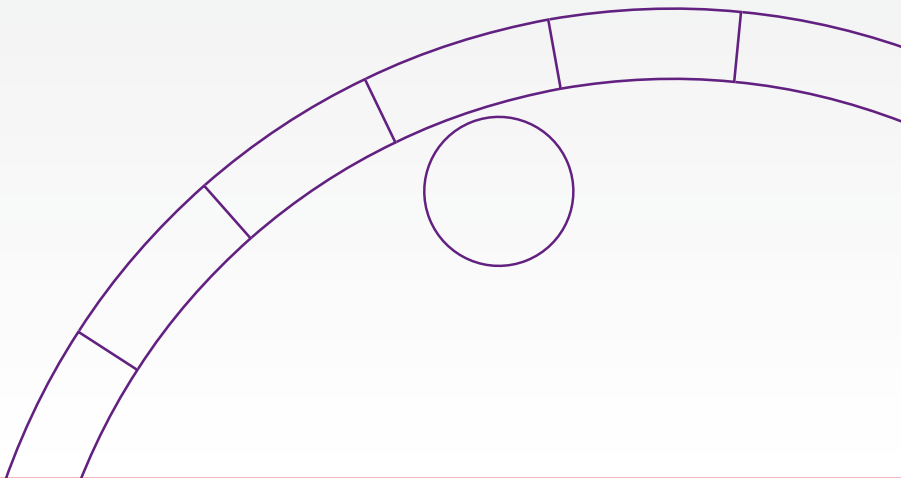


Marc Hartmann

EINFLUSS DES CALCIUM-AKTIVIERTEN KALIUMKANALS AUF DIE LYSOPHOSPHATIDYLCHOLIN INDUZIERTE MONOZYTENADHÄSION AN HUMANEN ENDOTHELZELLEN

*Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen*



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Mit besonderem Dank an Patrick Hirscher für die Idee und Gestaltung des Covers.

**Einfluss des Calcium-aktivierten Kaliumkanals auf die
Lysophosphatidylcholin induzierte Monozytenadhäsion
an humanen Endothelzellen**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Marc Hartmann

aus Walsrode

Giessen 2011

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik I

Abteilung für Kardiologie und Angiologie

des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Giessen

Direktor: Prof. Dr. med. Harald Tillmanns

Erster Gutachter: Prof. Dr. A. Erdogan

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. R. Geyer

Tag der Disputation: 14.07.2011

Meinen Eltern
Ilse und Oskar Hartmann

Meinen Großeltern
Marie und Oskar Hartmann

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Anatomie und Physiologie des Endothels	6
1.2 Pathophysiologie der Arteriosklerose und die Rolle der Endothelzellen	8
1.3 Membranpotential und Ionenkanäle in Endothelzellen	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Zellkultur	14
2.1.1 Zellisolation	14
2.1.2 Zellidentifikation	15
2.1.3 Zellkultivierung	16
2.2 Fluoreszenzmessung des Zellmembranpotentials	18
2.3 Adhäsionsversuche	20
2.3.1 [³ H]-Thymidin-Markierung	20
2.3.2 Vorbereitung der Zellen für die Adhäsionsversuche	21
2.3.3 Stimulation der Zellen	21
2.3.3.1 Einfluss der Inkubationszeit	21
2.3.3.2 Einfluss des Calciums	22
2.3.3.3 Einfluss der Radikalbildung	22
2.3.3.4 Einfluss des BK _{Ca}	23
2.3.4 Durchführung der Adhäsionsversuche	23
2.4 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	25
2.4.1 Methodik der FACS-Scan-Analyse	25
2.4.2 Herstellung des FACS-Waschpuffers	25
2.4.3 Stimulation der Zellen	26
2.4.4 Gewinnung der Proben	27
2.4.5 Durchführung der FACS-Scan-Analyse	28
2.5 Statistik	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Messung des Membranpotentials	30
3.1.1 Wirkung von LPC auf das Membranpotential	30

Inhaltsverzeichnis

3.1.2	Blockade des BK _{Ca} mit Iberiotoxin	31
3.2	Adhäsionsversuche	32
3.2.1	Einfluss der Inkubationszeit auf die Adhäsion	33
3.2.1.1	Stimulierte U937-Monozyten auf unstimulierten HUVEC	33
3.2.1.2	Stimulierte HUVEC auf unstimulierten U937-Monozyten	34
3.2.2	Einfluss von Calcium auf die Adhäsion	35
3.2.3	Einfluss von Radikalen auf die Adhäsion	36
3.2.4	Einfluss des BK _{Ca} auf die Adhäsion	38
3.3	Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM	39
4	Diskussion	42
4.1	BK _{Ca} - Modulation durch Lysophosphatidylcholin	42
4.2.	BK _{Ca} vermittelte Monozytenadhäsion und Expression von ICAM und VCAM	44
4.3	Die Adhäsion in Abhängigkeit von Calcium und radikalen Sauerstoffspezies	49
4.4	Betrachtung der Ergebnisse unter klinischen Gesichtspunkten	56
5	Zusammenfassung	58
6	Literaturverzeichnis	61
7	Abkürzungsverzeichnis	73
8	Erklärung	75
9	Publikationen	76
10	Danksagung	78
11	Lebenslauf	79

1. Einleitung

Die Einleitung gliedert sich in vier Teile. Die ersten beiden Abschnitte befassen sich mit den biologischen Eigenschaften des Endothels und die pathophysiologischen Grundlagen im Rahmen der Arteriosklerose. Anschließend werden einige Ionenkanäle besprochen. Im Abschnitt 1.4 wird der Hintergrund der eigentlichen Fragestellung dargelegt.

1.1 Anatomie und Physiologie des Endothels

Der Aufbau der Arterienwand ist stets gleich und besteht aus drei Schichten, die sich histologisch deutlich voneinander abgrenzen: Tunica intima (kurz: Intima), Tunica media (Media) und Tunica externa (Adventitia).

Die Intima ist von einem einschichtigen Endothel ausgekleidet und ist als innerste Schicht der Blutgefäße der Schubspannung des vorbeiströmenden Blutes ausgesetzt. Dem darauf aufsitzenden dünnen bindegewebigem Stratum subendotheliale folgt die Tunica media, die je nach Arterienabschnitt unterschiedliche Anteile an glatten Muskelzellen, kollagenen Fibrillen und elastischen Fasern enthält. Die Tunica media wird nach innen zur Intima von der Membrana elastica interna und nach außen, zur Adventitia, von der Membrana elastica externa umschlossen. Die Adventitia besteht aus unterschiedlich dicken Bündeln kollagener Fibrillen, elastischen Fasern und Fibrozyten und verankert das Gefäß mit dem jeweiligen Organ.

Die Endothelzellen bilden eine in geringem Maße durchlässige Membran zwischen dem Blut und dem angrenzenden Gewebe. Sie überlappen sich in ihren interendothelialen Grenzschichten dachziegelartig und sind durch Zell-Zellkontakte sogenannten Tight junctions (Zonula adhaerens, Punctum adhaerens, Zonula occludens) miteinander verbunden. Eine Sonderstellung nehmen die als Gap Junctions oder Nexus bezeichneten Zellkontakte ein. Sie verbinden die zytoplasmatischen Kompartimente der Zellen über transzelluläre Proteinkanäle. Jeder Proteinkanal wird dadurch gebildet, dass sich ein Halbkanal (Connexon) mit einem anderen Halbkanal der Nachbarzelle verbindet. Diese Kanäle erlauben eine metabolische oder elektrische Kommunikation zwischen den Zellen [1,2].

Einleitung

Das Endothel ist in vielfältiger Weise in die Regulation der Gewebshomöostase eingebunden. Als sensibles Organ ist es befähigt z.B. Änderungen des Blutdrucks und des Blutflusses zu registrieren sowie eine Vielzahl anderer mechanischer und humoraler Reize zu erfassen. Durch die Produktion von vasoaktiven Substanzen wie zum Beispiel Prostaglandin, Thromboxan A₂, Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin-1, C-Typ Natriuretischem Peptid (CNP) und *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) reguliert das Endothel den Gefäßtonus. Es reguliert durch Bildung von thrombotischen und antithrombotischen Faktoren wie Prostacycline, Thrombin, von-Willebrand-Faktor, Plättchen-aktivierender Faktor, Protein C und Plasminogenaktivatoren die Blutgerinnung. Das Endothel beeinflusst die Zellproliferation durch die Synthese von Wachstumsfaktoren wie *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) und *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF). Darüber hinaus ist das Endothel an der Verstoffwechselung von Lipiden und Cholesterinen im Blut beteiligt und in der Lage das cholesterintragende *Low Density Lipoprotein* (LDL) oxidativ zu modifizieren. Dieser Oxidationsvorgang stellt eine Belastung des Endothels dar und ist somit ein wichtiger Faktor in der Entstehung der Arteriosklerose [3-5].

1.2 Pathophysiologie der Arteriosklerose und die Rolle der Endothelzellen

In der Pathogenese der Arteriosklerose spielt das Endothel eine entscheidende Rolle. Nach der „*response to injury*“-Hypothese von Ross steht eine schädigende Einwirkung auf das Gefäßendothel am Anfang der Artherogenese [5]. Als endothelschädigende Faktoren können z.B. Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen, Diabetes mellitus und Infektionen mit Bakterien und Viren wirksam werden. Als Antwort auf diese Faktoren kann es zu einer endothelialen Dysfunktion kommen. Diese ist nach Furchgott definiert als eine paradoxe Vasokonstriktion nach Gabe von Acetylcholin [7,8], beziehungsweise eine inadäquate Reaktion auf vasodilatative Stimuli [9].

Die endotheliale Dysfunktion äußert sich durch eine verstärkte Zelladhärenz, eine verstärkte Gefäßpermeabilität und pro- statt antikoagulatorischen Eigenschaften [5,6].

Bei Stoffwechselkrankheiten z.B. dem Diabetes mellitus kann es zu erhöhten Konzentrationen von oxidiertem LDL (oxLDL) bzw. seinem Hauptbestandteil Lysophosphatidylcholin (LPC) kommen. LPC entsteht bei der oxidativen Modifikation von LDL zu oxLDL, wobei Cholesterin und Phosphatidylcholin durch die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT) in Cholesterinester und Lysophosphatidylcholin überführt werden. Die Cholesterinester stellen die Speicherform des Cholesterins in den oxLDL-Partikeln dar [10,11].

Im Zuge dieser chronischen Belastung des Endothels mit oxLDL bzw. Lysophosphatidylcholin führt dies nicht nur zu einer endothelialen Dysfunktion sondern auch zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der endothelialen Oberfläche [12-14,15]. Die *Intercellular Adhesion Molecules* (ICAM) und die *Vascular Adhesion Molecules* (VCAM) sind zusammen mit den Selektinen (E-Selektin und P-Selektin) die wichtigsten endothelialen Adhäsionsmoleküle [5]. Sie erleichtern Monozyten, Makrophagen und T-Zellen die Adhäsion an das Endothel und die anschließende Transmigration in den subendothelialen Raum [16-18]. Dort nehmen diese Phagozyten überschüssiges oxLDL auf, welches durch die endotheliale Dysfunktion eingeschwemmt wurde. Da die oxLDL-Partikel nicht verstoffwechselt werden können, findet eine Anhäufung intraphagozytär statt. Mikroskopisch erscheinen diese Phagozyten dann als sogenannte Schaumzellen. Durch die Ansammlung von Schaumzellen und T-Zellen entwickeln sich die

sogenannten *fatty-streaks*, welche die Grundlage für die endgültigen arteriosklerotischen Plaques bilden [19].

Aikawa et al. zeigten, dass sich histologisch in der Aorta von Kaninchen nach diätetischer Zufuhr von oxLDL vermehrt *fatty-streaks* nachweisen lassen. Zusätzlich reduziert sich die Produktion des vasodilatierenden Stickstoffmonoxid (NO) [19]. Außerdem bilden die Endothelzellen reaktiv als Zeichen der Stressbelastung vermehrt *Reactive Oxygen Species* (ROS). Diese Radikalbildung veranlasst die Zellen dazu vermehrt ICAM und VCAM auf ihrer Oberfläche zu exprimieren sowie das *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) auszuschütten [19]. Nicht nur oxLDL sondern auch sein Hauptbestandteil LPC vermag eine deutliche Steigerung der MCP-1 Synthese herbeizuführen [10-11, 19-21].

Durch die Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen durch aktivierte Schaum- und Endothelzellen werden zum einen weitere Monozyten und Makrophagen rekrutiert und zum anderen wird die Proliferation von glatten Gefäßmuskel Zellen (VSMC) induziert. Durch diesen fortschreitenden Prozess wächst der arteriosklerotische Plaque weiter an. Am Ende dieses „Circulus vitiosus“ steht der stenosierende fibröse Plaque. Dieser kann durch verminderten Blutfluss ischämische Symptome verursachen oder nach Ruptur zum akuten Gefäßverschluss führen [5,6].

Die Störung endothelialer Zellfunktionen trägt maßgeblich zur Entstehung von Arteriosklerose bei. Die Steuerung endothelialer Zellfunktionen, z.B. die Bildung und Freisetzung von Mediatoren, ist essentiell abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration.

Die Calciumhomöostase kann auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden. Zum einen kann intrazellulär gespeichertes Calcium z.B. aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden und zum anderen kann ein externer Calciumeinstrom in die Zelle erfolgen. Dieser externe Einstrom erfolgt in Endothelzellen überwiegend passiv durch nicht selektive Kationen-Kanäle da spannungsabhängige Calciumkanäle von diesen Zellen nicht exprimiert werden [22, 23]. Die treibende Kraft für den sogenannten kapazitiven Calciuminflux ist somit lediglich vom elektrochemischen Gradienten der Zelle abhängig. Dieser Gradient wird über den Füllungszustand der intrazellulären Calciumspeicher und über Änderungen des Membranpotentials beeinflusst. Das Membranpotential wird in erster Linie durch Kalium-Kanäle moduliert. Werden diese z.B. durch Acetylcholin aktiviert, so führt dies

Einleitung

zu einer Hyperpolarisation mit Veränderung der Membranspannung. Die Spannungsänderung erhöht somit den elektrochemischen Gradient für Calcium. Infolgedessen strömt vermehrt extrazelluläres Calcium in die Zelle. Ionenkanäle sind somit maßgeblich an der Aufrechterhaltung der intrazellulären Calciumhomöostase beteiligt. Es ist zu vermuten, dass auch andere calciumabhängige Signaltransduktionswege in der Zelle indirekt durch Ionenkanäle beeinflusst werden [23-25].

1.3 Membranpotential und Ionenkanäle in Endothelzellen

Endothelzellen gelten im Allgemeinen als nicht erregbare Zellen, da sie im Gegensatz zu Muskelzellen nicht in der Lage sind Aktionspotentiale fortzuleiten. Dennoch sind sie in der Lage durch verbindende Porenproteine wie Gap junctions elektrochemisch zu kommunizieren [26]. Des Weiteren besteht eine Verbindung zu glatten Muskelzellen. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben z.B. Informationen über Blutdruck und Blutfluss an die regulierend wirkenden glatten Muskelzellen weiterzugeben [27].

Das Membranpotential der Endothelzellen wird in erster Linie durch Kalium- und Chloridkanäle aufrechterhalten. In Endothelzellen werden verschiedene Kaliumkanäle exprimiert und funktionell unterschieden. Es finden sich u.a. einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (*Inwardly rectifying K⁺ channels* - K_{ir}), ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP}) und Calcium-aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca}). Der K_{ir} fungiert als „Kalium-Sensor“ in der Zelle. Bereits geringe Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration erhöht seine Leitfähigkeit und steuert somit frühzeitig depolarisierenden Effekten suffizient entgegen. Er ist damit der wichtigste Faktor zur Stabilisierung des Membranpotentials. Eine Aktivierung des K_{ir} durch Scherkräfte führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle.

Unter hypoxischen bzw. ischämischen Bedingung kommt es intrazellulär zu einer Abnahme der ATP-Konzentration. Diese Energieverarmung der Zelle aktiviert den K_{ATP} mit nachfolgender Membranhyperpolarisation. Unter physiologischen Bedingungen ist der Kanal geschlossen [22].

Die Calcium-aktivierten Kaliumkanäle (K_{Ca}) kann man auf Grund ihrer Leitfähigkeiten in drei Gruppen unterteilen: Kaliumkanäle mit geringer Leitfähigkeit (*small conductance* - SK_{Ca}, Leitfähigkeit 10-14 picco Siemens [pS]), mittlerer Leitfähigkeit (*intermediate conductance* - IK_{Ca}, Leitfähigkeit 30-80 pS) und großer Leitfähigkeit (*big conductance* - BK_{Ca}, Leitfähigkeit 100-250 pS) [22,28].

Die Aktivität des BK_{Ca} ist von der intrazellulären Calciumkonzentration und von anliegender Spannung abhängig. Der BK_{Ca} besteht aus sechs transmembranären Segmenten. Zwischen dem neunten und zehnten Segment sind auf der zytoplasmatischen Seite sehr stark negativgeladene Aminosäuren vorhanden, die die Ca²⁺-Ionen wie in einer Schale aufnehmen. Dieser sog. *Calcium-bowl* enthält vier Bindungsstellen. Sind mindestens zwei dieser Bindungsstellen durch Calciumionen

besetzt, so erhöht sich die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals [22, 24, 28-31]. Aufgrund der großen Leitfähigkeit und der hohen Selektivität für Kaliumionen führt die Aktivierung des BK_{Ca} zu einem starken Kaliumefflux und zu einer Membranhypolarisation. Die Hypolarisation führt zu einer Erhöhung des elektrochemischen Gradienten für Calcium und dadurch zu einem Calciumeinstrom in die Zelle. Der BK_{Ca} nimmt somit Einfluss auf die Calciumhomöostase der Zelle und verstärkt sich in seiner Aktivität selbst.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der BK_{Ca} durch Modulation seiner Aktivität Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Endothelzellen nimmt [32]. Ebenso wurde die Beteiligung des Ionenkanals an der Regulation des Gefäßtonus beschrieben [33-34]. Unter physiologischen Bedingungen wird der Ionenkanal u.a. durch Bradykinin aktiviert [22]. Der BK_{Ca} kann wenig spezifisch sowohl durch Tertaethylammonium (TEA) als auch durch Charybdotoxin inhibiert werden [35-36]. Galvez et al. entdeckten 1990 ein hoch spezifischen Inhibitor des BK_{Ca} in dem Gift des indischen Skorpions *Buthus tamulus* und konnten es als erste isolieren. Dies von ihnen benannte Iberitoxin (IBX) bindet nur an den BK_{Ca} und blockiert den Kanal reversibel. Mit anderen Ionenkanälen geht IBX keine Bindung ein. Damit eröffnet sich die Möglichkeit den BK_{Ca} gezielt von anderen Ionenkanälen zu unterscheiden und seine Einflüsse auf die Zelle zu untersuchen [36-37].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es zu ermitteln, ob Lysophosphatidylcholin (LPC) die Adhäsion von U937-Monozyten an humanen Nabelschnur Endothelzellen über den Calcium-aktivierten Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}) induziert.

Zunächst sollte geklärt werden, ob der Adhäsionsprozess primär durch humane Endothelzellen oder U937-Monozyten induziert wird.

Anschließend wurde die Adhäsion auf ihre Calcium- und Radikalabhängigkeit überprüft.

Auf molekularer Ebene wurde schließlich untersucht, ob der BK_{Ca} einen regulierenden Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM hat und ob dieser Prozess calcium- und radikalabhängig ist.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die Endothelzellen wurden aus humanen Nabelschnurvenen (*Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells*; HUVEC) in Anlehnung an die Methode von Jaffe et al. isoliert, identifiziert und kultiviert [38]. Die Vorgehensweise wird in den folgenden Abschnitten 2.1.1 bis 2.1.3 näher erläutert.

2.1.1 Zellisolation

Die Nabelschnur wurde direkt nach der Geburt von der Plazenta abgetrennt und in einen sterilen mit HEPES (PAA, Linz, Österreich) gefüllten Becher gegeben. Die Nabelschnur wurde gesäubert und makroskopisch auf Verletzungen inspiziert. Eventuelle Verletzungen wurden herausgeschnitten und verworfen. Nun wurde mittels Knopfkanüle die Nabelschnurvene aufgesucht und diese zweimal mit 50 ml HEPES gespült. Auf diese Weise wurde das restliche Blut ausgewaschen und die Vene auf ihre Drainierbarkeit überprüft. Anschließend wurde die Nabelschnurvene am anderen Ende abgeklemmt und mit 10 ml 0,025% Collagenaselösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) befüllt. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 20 Minuten, um die humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) aus ihrem Zellverband zu lösen. Während dessen wurde 1 ml fetales Kälberserum (FCS; PAA, Linz, Österreich) in ein 50 ml Röhrchen (Becton Dickinson, USA) vorgelegt. Das FCS stoppt die Reaktion der Collagenase ab und verhindert somit eine Lyse der Zellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Vene nochmals mit 30 ml HEPES gespült und die Collagenaselösung mit den enthaltenen HUVEC in dem vorbereiteten Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml *Endothelial Basal Medium* (EBM; Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) inklusive der folgenden Aliquots (alle Promo Cell, Heidelberg, Deutschland): 0.4% ECGS/H, *Epidermal Growth Factor* 0.1 ng/ml, Hydrocortison 1 µg/ml, *basic Fibroblast Factor* 1 ng/ml; Amphotericin 50 ng/ml, Gentamycin 50 µg/ml und 20% FCS (PAA, Linz, Österreich) resuspendiert.

Abschließend wurde 1 ml der Zellesuspension auf vier mit 0,2% Gelatine (Serva, Heidelberg, Deutschland) vorbeschichtete 25 cm² Plastik Kulturschälchen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und mit EBM auf 2 ml aufgefüllt.

2.1.2 Zellidentifikation

Die Zellidentifikation erfolgte zum einen mit der Beurteilung der Morphologie unter dem Lichtmikroskop und zum anderen mit der Immunfluoreszenzmethode.

In der lichtmikroskopischen Untersuchung erscheinen Endothelzellen als große, polygonale Zellen mit homogenem Zellplasma und einem ovalen, zentralangeordneten Zellkern. Die Zellmembranen sind klar voneinander abgrenzbar. Endothelzellen wachsen ausschließlich in einem konfluenten Monolayer, was an ein Kopfsteinpflaster erinnert (*Cobblestone*-Phänomen).

Fibroblasten und glatte Muskelzellen hingegen wachsen nicht als Monolayer sondern als sich gegenseitig überlappende Zellgruppierungen. Dabei imponieren sie als schlanke, spindelförmige Zellen, deren Zellgrenzen verwischen.

Um Endothelzellen immunologisch zu identifizieren, werden sie zunächst auf Deckgläschen ausgesät, kultiviert und anschließend mit Methanol bei -20°C fixiert. Die Zellen wurden nun mit einem Antikörper gegen den von-Willebrand-Faktor (Dakopatts GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert, um in einem weiteren Schritt einen sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-FITC; Dianova, Hamburg, Deutschland) gegen den von-Willebrand-Antikörper anzuheften. Da Endothelzellen als einzige den von-Willebrand-Faktor auf ihrer Oberfläche exprimieren, können sie so unter dem Mikroskop durch die Fluoreszenz des zweiten Antikörpers eindeutig als Endothelzellen identifiziert werden.

2.1.3 Zellkultivierung

Im folgenden Abschnitt wird die Kultivierung der Endothelzellen beschrieben.

Die HUVEC wurden im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Wenn in den Petrischalen der Primärkultur ein konfluenten Monolayer gewachsen war, wurden die Zellen in mit Gelatine vorbeschichtete 25 cm² Plastikkulturflaschen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Als Nährmedium wurde das in Kapitel 2.1.1 beschriebene EMB verwendet. Die Konzentration des FCS wurde jedoch auf 10% reduziert. Außerdem konnte auf die Gabe von Amphotericin B verzichtet werden. Das Nährmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Wenn die Plastikkulturflaschen konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen passagiert. Um die Zellen vom Boden der Flasche zu lösen wurden sie zunächst mit Trypsin EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) überschichtet und vorübergehend im Brutschrank inkubiert. Der Prozess der Ablösung wurde ständig unter dem Mikroskop kontrolliert um eine Lyse der Zellen zu vermeiden. Durch die Gabe von FCS wurde dieser Vorgang abgestoppt und anschließend mit 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit Nährmedium resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen in einer Dichte von ca. 3000/cm² in einer mit 0,2% Gelatine vorbeschichteten Plastikkulturflasche erneut ausgesät.

Die Proliferation und die Zellmorphologie der HUVEC wurden täglich mit dem Lichtmikroskop kontrolliert. Eventuelle mikrobielle Kontaminationen konnten so ebenfalls erkannt werden. Die betroffenen Kulturflaschen wurden gegebenenfalls entsorgt.

Für die Membranpotentialmessungen wurden die HUVEC auf mit Gelatine vorbeschichtete Glasplättchen (Coverslips) ausgesät. Die Zellaussaat für die Adhäsionsversuche erfolgte in 24-well-Platten mit Gelatine. Die Zellen für die Expressionsversuche wurden in 25 cm² Plastikpetrischalen kultiviert. Eine gesonderte Beschreibung der Kultivierung erfolgt in den jeweiligen Kapiteln.

Für die Adhäsionsversuche wurden neben den Endothelzellen immortalisierte Monozyten der Tumorzelllinie U937 verwandt. Die Kultivierung der Zelllinie wird im Folgenden näher beschrieben.

Material und Methoden

Zunächst wurde ein Nährmedium aus RPMI (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) hergestellt und steril filtriert.

Die Monozyten wurden in 75 cm² Plastikkulturflaschen mit 15 ml des zuvor hergestellten RPMI-Mediums kultiviert. Es wurde alle zwei bis drei Tage ein kompletter Mediumwechsel vorgenommen. Dazu wurden die Monozyten in ein 50 ml-Röhrchen überführt, bei 1200 rpm für 5min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit 15 ml Nährmedium resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen erneut in Kulturflaschen ausgesät.

Alle fünf Tage wurden die U937 Zellen aufgeteilt. Dazu wurden nach dem Zentrifugieren und Resuspendieren jeweils nur 2ml der Zellsuspension entnommen und auf vier neue 75 cm² Flaschen ausgesät. Es wurde jeweils auf ein Volumen von 15 ml mit antibiotikaversetztem RPMI-Medium aufgefüllt.

2.2 Fluoreszenzmessungen des Zellmembranpotentials

Durch Messung des Membranpotentials wurde zunächst überprüft, ob sich der BK_{Ca} durch Lysophosphatidylcholin modulieren lässt und bei welcher Konzentration dieser Effekt seine maximale Ausprägung hat. Es wurde zunächst eine Konzentrationsreihe erstellt und das Membranpotential gemessen. Anschließend wurden die Endothelzellen mit Iberitoxin (IBX) inkubiert, um eine BK_{Ca} -abhängige Änderung des Membranpotentials nachzuweisen.

Die Änderungen des Zellmembranpotentials kann mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs *Bis-1,3-Dibutylbarbituric acid-trimethine oxonol* (DiBAC) optisch erfasst werden. Das negativ geladene DiBAC kann frei durch die Zellmembran diffundieren. In der Zelle bindet DiBAC an zytoplasmatische Proteine und bewirkt eine Fluoreszenzverstärkung des Farbstoffes. Die Fluoreszenz des freien Farbstoffes innerhalb und außerhalb der Zelle ist beträchtlich kleiner als die des DiBAC-Protein-Komplexes und vernachlässigbar.

Das Gleichgewicht zwischen dem intrazellulären freien Farbstoff und dem Farbstoff-Proteinkomplex ist von der Dissoziationskonstante abhängig. Die Menge des intrazellulären Farbstoff-Proteinkomplexes ist damit indirekt von dem jeweiligen Membranpotential abhängig. Je negativer das Membranpotential ist (Hyperpolarisation), desto weniger DiBAC diffundiert durch die Zellmembran. Die intrazelluläre freie Menge des DiBAC und folglich auch die zytoplasmatische Proteinbindung sind damit geringer. Dies resultiert in einer Intensitätsabnahme der Fluoreszenz. Bei einer Depolarisation der Zellmembran verhält es sich gegensätzlich [39].

Zur Vorbereitung der Fluoreszenzmessungen wurden die HUVEC zunächst auf ein mit 0,2 % Gelatine vorbeschichtetes Glasplättchen (*Coverslip*) ausgesät und für drei Tage mit komplettem Nährmedium bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Wenn die Zellen eine Dichte von circa 70-85% erreicht hatten, konnten sie verwendet werden. Zunächst wurde eine Lösung (140 mmol/l NaCl, 5,5 mmol/l D-Glucose, 10 mmol/l HEPES, 5 mmol/l KCl, 0,5 mmol/l MgCl, 1,5 mmol/l CaCl) hergestellt und durch Zugabe von NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt. Anschließend wurde DiBAC (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in einer Konzentration von 0,5 µmol/l

zugefügt. Nach Absaugen des Nährmediums wurden die HUVEC mit der hergestellten Lösung unter Lichtausschluss bei 37°C für 15-30 min inkubiert.

Nun wurde der *Coverslip* aus der Petrischale entnommen und in eine beheizte Messkammer eingespannt. Als Kammermedium wurde die hergestellte Lösung mit DiBAC verwendet. Die Messungen erfolgten unter einem Fluoreszenzmikroskop mit 20-facher Vergrößerung (IX 70, Olympus; Hamburg, Deutschland). Die Fluoreszenz wurde alle 6s bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und die emittierten Lichtsignale bei einer Wellenlänge von 535 nm detektiert. Änderungen der Fluoreszenz der einzelnen Zellen wurden computergesteuert mit dem TILL photonics Imaging System (TILL Photonics, Martinsried, Deutschland) erfasst und verarbeitet und als Mittelwert der einzelnen Zellen ausgegeben.

Nach einer Minute wurde LPC (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in die Messkammer eingebracht. Die Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von 30 min gemessen. Dabei wurde nach jeder Minute der Durchschnittswert aller gemessenen Zellen ermittelt. Die Werte wurden als Änderungen der DiBAC-Intensität (*Relative Fluorescence Units*; RFU) in Prozent angegeben.

Dieser Versuchsaufbau wurde jeweils mit unterschiedlichen LPC-Konzentrationen wiederholt um die Konzentration mit der stärksten Fluoreszenzausprägung zu ermitteln. Anschließend wurde der Versuch mit der ermittelten LPC-Konzentration unter Blockade des BK_{ca} mit 100 nmol/l Iberitoxin (IBX) (beide Sigma, Deisenhofen, Deutschland) durchgeführt.

2.3 Adhäsionsversuche

Zur Vorbereitung der Adhäsionsversuche wurde zunächst wie in 2.2.1 beschrieben eine Versuchsreihe angefertigt um die Konzentration der maximalen BK_{Ca}-Aktivierung herauszufinden. Diese Konzentration wurde für alle folgenden Adhäsionsversuche beibehalten.

In den Adhäsionsversuchen wurde zunächst untersucht, ob der Adhäsionsprozess primär durch humane Endothelzellen (HUVEC) oder U937-Monozyten induziert wird. Es sollte außerdem untersucht werden, ob die Inkubationszeit mit Lysophosphatidylcholin (LPC) einen Einfluss auf die Adhäsion hat.

Dazu wurden zunächst Monozyten unterschiedlich lang mit LPC inkubiert und die Adhärenz zu unstimulierten HUVEC untersucht. Anschließend wurden stimulierte HUVEC mit unstimulierten Monozyten untersucht. Es wurde jeweils eine Zeitreihe erstellt. Der Zeitpunkt der signifikanten Veränderung der Adhäsion wurde für die weiteren Adhäsionsversuche verwandt.

Weiterhin sollte mit Hilfe des Calciumchelators *1,2-Bis-(2-Amino-Phenoxy)ethane-N,N,N,N-Tetra-Acetate* (BAPTA), dem Calcium-Kanal-Blocker *2-Aminoethoxy-diphenyl Borate* (2-APB) und dem *Nicotinamide-Adenine-Dinukleotid-Phosphat* (NADPH)-Oxidase-Hemmstoff *Di-Phenylene-Iodonium* (DPI) die Calcium- und Radikalabhängigkeit der Adhäsion untersucht werden. Um in diesem Zusammenhang den Einfluss des BK_{Ca} zu testen wurde dieser Kanal spezifisch mit Iberiotoxin inhibiert.

2.3.1 [³H]-Thymidin-Markierung

Die Adhäsion wurde in allen Versuchen mit Hilfe von Tritium-Thymidin gemessen. Thymidin ist ein Nukleosid, das von der Zelle zur DNA-Synthese benötigt wird. Diese Eigenschaft macht man sich zunutze um die Zellen radioaktiv zu markieren. Stellt man der Zelle radioaktives Tritium-Thymidin zu Verfügung, so wird dieses in die Zell-DNA eingebaut und die Zelle radioaktiv markiert.

Das Tritium [³H] sendet bei seinem Zerfall β -Strahlen (Elektronen) aus. Diese Elektronen werden mit einem Szintillationscocktail detektiert. Dieser Cocktail enthält organische Verbindungen, die durch die emittierten Elektronen angeregt werden und

Photonen (Lichtblitze) aussenden. Diese Lichtemissionen werden durch den β -Counter quantitativ erfasst. Es wurden in diesem Versuch nur die U937-Zellen radioaktiv markiert und die Aktivität der adhärenen Monozyten im Vergleich zur Kontrollaktivität in Prozent gemessen.

2.3.2 Vorbereitung der Zellen für die Adhäsionsversuche

Zur Markierung der Monozyten wurde eine dicht mit U937-Zellen bewachsene 75 cm² Plastikkulturflasche (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) aus der aktuellen Passage verwendet. Die Zellen wurden zunächst zentrifugiert und mit 80 ml RPMI (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit [³H]-Thymidin (10 μ Ci/ml, Amersham, Freiburg, Deutschland) versetzt und für mindestens 18h inkubiert.

Die HUVEC wurden in 24-well-Platten (Becton Dickinson, USA) mit *Endothelial Basal Medium* (EBM; Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) ausgesät. Wenn sie konfluent gewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt und mit frischem EBM (250 μ mol/well) versetzt.

2.3.3 Stimulation der Zellen

2.3.3.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Monozytenadhäsion

Um herauszufinden, ob die alleinige Stimulation der Monozyten mit LPC einen Effekt auf die Adhäsion hat, wurden zunächst nur die U937-Zellen mit 20 μ mol/l LPC zwischen null und 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte jeweils zu den Messzeitpunkten t=0h, t= 0,25h, t=0,5h, t=1h, t=4h und t=24h. Bei diesem Experiment wurden die HUVEC nicht weiter stimuliert.

In weiteren Versuchen wurden nur die HUVEC mit Lysophosphatidylcholin (LPC; 20 μ mol/l) zwischen null und vier Stunden inkubiert. Die U937-Zellen wurden hierbei nicht stimuliert.

2.3.3.2 Einfluss des Calciums auf die Monozytenadhäsion

Um die Auswirkungen des Calciums auf die Adhäsion zu untersuchen wurden die HUVEC neben LPC zusätzlich mit dem Calciumchelator BAPTA (10 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert und in einem weiteren Versuch der transmembranäre Calciumeinstrom in die Zelle mit 2-APB (100 $\mu\text{mol/l}$) geblockt (beide Calbiochem, Bad Soden, Deutschland).

Zunächst wurde die Monozytenadhäsion unter Einfluss von LPC untersucht. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne LPC angelegt und in der späteren Auswertung als Referenzwert mit 100% festgesetzt. Anschließend wurde jeweils eine Probe mit LPC plus BAPTA bzw. 2-ABP untersucht. Um zytotoxische bzw. durch die Inhibitoren induzierte Adhäsionseffekte auszuschließen, wurde zusätzlich jeweils eine Negativkontrolle (ohne LPC) nur mit BAPTA und 2-ABP durchgeführt. Es wurde in allen Versuchen für vier Stunden stimuliert.

2.3.3.3 Einfluss der Radikalbildung auf die Monozytenadhäsion

Endothelzellen sind in der Lage, auf unterschiedlichem Wege intrazelluläre Radikale Sauerstoff Species (ROS) zu bilden. Da bereits in anderen Arbeiten eine LPC induzierte und BK_{Ca} -vermittelte Radikalbildung über die Xanthinoxidase, die Cyclooxygenase, als auch die *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS), ausgeschlossen wurden, wurde in Versuch 3.2.3 die NADPH-Oxidase-vermittelte Radikalbildung näher untersucht.

Mit Hilfe des NADPH-Oxidase-Hemmstoffs DPI (5 $\mu\text{mol/l}$, Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) wurde die Radikalbildung in den HUVEC unterdrückt. Dazu wurden die Zellen für vier Stunden mit LPC bzw. LPC plus DPI inkubiert. Außerdem wurde eine Negativkontrolle ohne Stimulans angelegt und eine Negativkontrolle mit DPI um mögliche Effekte des Hemmstoffs zu erfassen.

2.3.3.4 Einfluss des BK_{Ca} auf die Monozytenadhäsion

Mit diesem Versuch sollte überprüft werden, ob der BK_{Ca} in HUVEC einen regulierenden Einfluss auf die monozytäre Adhäsion nimmt. Dafür wurden die HUVEC wiederum mit LPC (20 µmol/l) für vier Stunden inkubiert und der BK_{Ca} spezifisch mit Iberiotoxin (IBX 100 nmol/l, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) blockiert. Auch hier wurde eine Kontrolle ohne LPC angelegt und zum Ausschluss zytotoxischer Effekte eine zusätzliche Probe nur mit IBX untersucht.

2.3.4 Durchführung der Adhäsionsversuche

Die radioaktiv markierten U937-Zellen wurden zunächst in zwei Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Anschließend wurde mit RPMI resuspendiert (2,5 ml RPMI pro 24-well-Platte mit HUVEC) und 100 µl der Suspension zu den HUVEC gegeben. Nach einer Adhäsionszeit von einer Stunde bei 37°C im Brutschrank, wurde die Suspension vollständig abpipettiert und verworfen. Die nicht adhärenen Monozyten wurden durch zweimaliges Waschen mit je 250 µl *Phosphate Buffered Saline* (PBS, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) entfernt. Die verbliebenen Zellen wurden durch Zugabe von 250 µl NaOH [0,1 M] (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) lysiert und somit vom Boden der 24-well-Platte gelöst. Das Lysat wurde in Szintivials (Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) überführt und mit 2,5 ml Szintilationscocktail (Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) aufgefüllt. Der β-Counter (Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) wurde mit den Proben bestückt und die Lichtemissionen gemessen. Hierbei korreliert die quantitative Steigerung der Lichtemissionen mit der Menge radioaktivmarkierter Monozyten im Zelllysat. Tabelle 1 verdeutlicht das für die Adhäsionsversuche durchgeführte Stimulationsprotokoll.

Stimulationsprotokoll der Adhäsionsversuche

Bindung des freien Calciums	Hemmung des Kapazitiven Calciueinstroms	Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität	Blockade der BK _{Ca} -Aktivität
1. Kontrolle	1. Kontrolle	1. Kontrolle	1.Kontrolle
2. LPC	2. LPC	2. LPC	2. LPC
3. LPC + BAPTA	3. LPC + 2-APB	3. LPC + DPI	3. LPC + IBX
4. BAPTA	4. 2-APB	4. DPI	4. IBX

Tab. 1: Stimulationsprotokoll zur Messung der Monozytenadhäsion in Abhängigkeit von Calcium (BAPTA), dem kapazitivem Calciueinstrom (2-APB), der NADPH-Oxidase (DPI) und des calcium-aktivierten Kaliumkanals mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca})

2.4 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

2.4.1 Methodik der FACS-Scan-Analyse

Die *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)-Methode arbeitet nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie und dient der Messung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in einer Suspension. Durch die Wechselwirkung der Zelle mit dem einfallenden Lichtstrahl kommt es zur Streuung. Die Zellen werden in einem konstanten Flüssigkeitsstrom einzeln aufgetrennt und im Analysepunkt des Gerätes von einem Laser belichtet. Die Lichtemissionen werden von Spiegel- und Filtersystemen erfasst und mit Hilfe eines Computers in numerische Signale umgesetzt.

In diesem Versuch wurden die Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM zunächst mit jeweils einem Antikörper versehen, um anschließend an diesen einen zweiten fluoreszierenden Antikörper zu binden. Mit dieser Methode lassen sich die Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der einzelnen Zellen optisch sichtbar machen.

Mit Hilfe der FACS-Scan-Analyse sollte untersucht werden, ob LPC einen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM hat. Außerdem sollte geklärt werden, ob dabei die Expression von der Calciumkonzentration und der Radikalbildung abhängig ist.

2.4.2 Herstellung des FACS-Waschpuffers

Zunächst wurde ein PBS-Puffer hergestellt und anschließend mit 1M HCl auf pH 7,4 eingestellt. Dazu wurden folgende Salze in 5 Liter destilliertem und steril filtriertem Wasser unter Rühren gelöst: KCl 2,68 mmol/l, KH_2PO_4 0,29 mmol/l, NaCl 136,9 mmol/l, Na_2HPO_4 8,09 mmol/l (alle Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland).

Um den FACS-Waschpuffer herzustellen wurde von dieser Stammlösung 500 ml in eine Flasche überführt und mit 0,5 g BSA (Bovines Serum Albumin, PAA, Linz, Österreich) und 0,5 g NaN_3 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Dadurch entstand eine PBS-Lösung mit 0,1% BSA und 0,1% NaN_3 . Der FACS-Waschpuffer wurde für jede Versuchsreihe neu angesetzt.

2.4.3 Stimulation der Zellen

Zunächst wurden die HUVEC in einer mit 0,2% Gelatine (Serva, Heidelberg, Deutschland) beschichteten 25 cm² Plastikpetrischale mit 5 ml *Endothelial Basal Medium* (EBM; Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) ausgesät. Wenn die Zellen konfluent gewachsen waren, wurde das Nährmedium abgesaugt und anschließend die HUVEC mit der Inkubationslösung versetzt. Dazu wurde zunächst 5 ml RPMI (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) in ein Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson, USA) vorgelegt und mit den Stimulanzen versetzt. Es wurden für ICAM und VCAM jeweils fünf Gruppen angesetzt. Wie bei den Adhäsionsversuchen wurde auch bei der Messung der Adhäsionsmoleküle zunächst die Expression durch Lysophosphatidylcholin (LPC; 20 µmol/l) stimuliert. Das Calcium wurde mit BAPTA (10 µmol/l) gebunden, die NADPH-Oxidase mit DPI (5 µmol/l) inhibiert und der BK_{Ca} mit Iberitoxin (IBX; 100 nmol/l) geblockt. Zusätzlich wurde für jede Gruppe noch eine Negativ-Kontrolle ohne den Anti-ICAM- und Anti-VCAM-Antikörper erstellt, um später die Eigenfluoreszenz der Zellen zu ermitteln und von den gemessenen Werten zu subtrahieren. Die Zellen wurden für vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂- Gehalt von 5% inkubiert. Die folgende Tabelle verdeutlicht das Stimulationsprotokoll.

Versuchsprotokoll der FACS-Scan-Analyse

ICAM-Gruppe		VCAM-Gruppe	
Mit Antikörper	Ohne Antikörper	Mit Antikörper	Ohne Antikörper
1.Kontrolle	1.Kontrolle	1.Kontrolle	1.Kontrolle
2.LPC	2.LPC	2.LPC	2.LPC
3.LPC + BAPTA	3.LPC + BAPTA	3.LPC + BAPTA	3.LPC + BAPTA
4.LPC + DPI	4.LPC + DPI	4.LPC + DPI	4.LPC + DPI
5.LPC + IBX	5.LPC + IBX	5.LPC + IBX	5.LPC + IBX

Tab. 2: Stimulationsprotokoll der FACS-Scan-Analyse zur Messung LPC induzierten ICAM und VCAM Expression in Abhängigkeit von Calcium (BAPTA), der NADPH-Oxidase (DPI) und des Calcium-aktivierten Kaliumkanals mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca})

Aus verarbeitungs- und messtechnischen Gründen wurde das ursprüngliche Stimulationsprotokoll gekürzt um zu gewährleisten, dass für eine Messreihe aus der gleichen Passage die Inkubationszeiten eingehalten und die Zellen innerhalb einer adäquaten Zeit verarbeitet werden konnten. Daher wurde auf die alleinige Stimulation mit BAPTA, DPI und IBX zum Ausschluss zytotoxischer Effekte verzichtet, da sie bereits in den Adhäsionsversuchen durchgeführt worden waren. Ebenso wurde auf eine separate Untersuchung des kapazitiven Calciumeinstroms mit Hilfe von 2-ABP verzichtet, da hier nur eine generelle Calciumabhängigkeit der Adhäsionsmoleküle untersucht werden sollte.

2.4.4 Gewinnung der Proben

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde durch Absaugen und zweimaliges Spülen mit 4 ml *Hank's balanced salt solution* (HBSS, Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland) die Inkubation gestoppt. Die Zellen konnten aus der Petrischale durch Zugabe von 4 ml Trypsin EDTA-Lösung 1% (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gelöst werden. Dabei konnte die Abkuglung und Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden. Die abgelösten Zellen wurden in ein mit 1 ml FCS bestücktes Falconröhrchen überführt um den Ablösevorgang zu stoppen. Die Petrischalen wurden anschließend zweimal mit 4 ml HBSS gewaschen um eventuell noch abhaftende Zellen ebenfalls zu überführen. Es folgte die Zentrifugation der Zellen bei 1200 U/min für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml RPMI (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit der Neubauerkammer bestimmt und anschließend die Suspension auf eine Zellkonzentration von 2.000.000 Zellen/ ml verdünnt.

Es wurden 100 µl der Suspension in eine flexible 96-Well-Rundbodenplatte (Falcon, Beckton Dickinson, USA) überführt und bei 1200 U/min und 4°C für 3 min zentrifugiert (Varifuge, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet durch kurzes Rütteln vom Boden der Platte gelöst. Jedes Well wurde nun mit 20 µl humanem Immunglobulin G (IgG, Octagam 1:5 verdünnt, Octapharma Pharmaceutica, Österreich) versehen, um die unspezifischen Bindungen auf der Oberfläche der Zellen abzufangen. Nun wurden jeweils 5 µl der Antikörper gegen ICAM und VCAM (beide Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA) zu den jeweiligen Gruppen gegeben. Die Rundbodenplatte wurde für 30 min

auf Eis inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit dem zuvor angesetzten FACS-Waschpuffer gewaschen um überschüssigen Anti-CAM-Antikörper zu entfernen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde wie oben beschrieben jeweils zentrifugiert und gerüttelt. Mit dem fluoreszierenden sekundären Antikörper (*goat-anti-mouse*-PE, Imgenex, San Diego, USA) wurde ebenso verfahren. Die Inkubation erfolgte hier jedoch im Dunkeln, um den fluoreszierenden Antikörper vor einer Anregung durch Tageslicht zu schützen.

2.4.5 Durchführung der FACS-Scan-Analyse

Für die FACS-Analyse wurden nach den jeweiligen Gruppen in Glasröhrchen 500 µl der Trägerflüssigkeit „Cell-wash“ (Becton Dickinson, USA) vorgelegt. Die Zellen wurden nach dem Resuspendieren in die Glasröhrchen überführt. Mit Hilfe der Negativ-Kontrollgruppe wurde nun das FACS-Gerät so kalibriert, dass 95% der Zellen als negativ detektiert wurden. Dies ermöglichte später die Eigenfluoreszenz der Zellen von den gemessenen Werten zu subtrahieren.

2.5 Statistik

Die Ergebnisse aller erhobenen Daten repräsentieren grundsätzlich Mittelwerte aus mehreren Messreihen, die immer mit verschiedenen Zellpräparationen durchgeführt wurden. Die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) ist angegeben. Alle Daten wurden mittels ANOVA-Test gefolgt vom a post-hoc Tuckey-Test bzw. post-hoc holm-sidak-Test berechnet, wobei Unterschiede von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows (Version 11.0).

3. Ergebnisse

3.1 Messung des Membranpotentials

3.1.1 Wirkung von Lysophosphatidylcholin (LPC) auf das Membranpotential

Der Calcium-aktivierte Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit ist maßgeblich für die Aufrechterhaltung des elektrostatischen Gradienten der Zelle verantwortlich. Daher wurde zunächst das Membranpotential gemessen um herauszufinden, ob der BK_{Ca} durch Lysophosphatidylcholin Einfluss auf das Membranpotential hat und bei welcher Konzentration dieser Effekt seine maximale Ausprägung hat.

Dazu wurde eine Konzentrationsreihe von 5 µmol/l bis 100 µmol/l erstellt, wobei nach jeder Minute der Mittelwert errechnet wurde. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 min gemessen, da Kuhlmann et al. durch ihre *patch-clamp* Experimente zeigen konnten, dass nach einer dreißigminütigen Perfusionszeit mit LPC die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK_{Ca} nicht weiter zunimmt [97].

In diesem Versuch konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der DiBAC-Fluoreszenz beobachtet werden. Dies entspricht einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Es zeigte sich bereits eine signifikante Abnahme der Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle bei einer LPC-Konzentration von 5 µmol/l. Eine maximale Abnahme zeigte sich bei 20 µmol/l. Weitere Steigerungen der Konzentration hatten keinen stärkeren Effekt.

Aus diesem Grund wurde in allen weiteren Versuchen eine LPC-Konzentration von 20 µmol/l verwendet.

Die Ergebnisse der Membranpotentialmessung zum Zeitpunkt t=30 Minuten sind in Abbildung 1. dargestellt.

Konzentrationsabhängiger Einfluss von LPC auf das Membranpotential

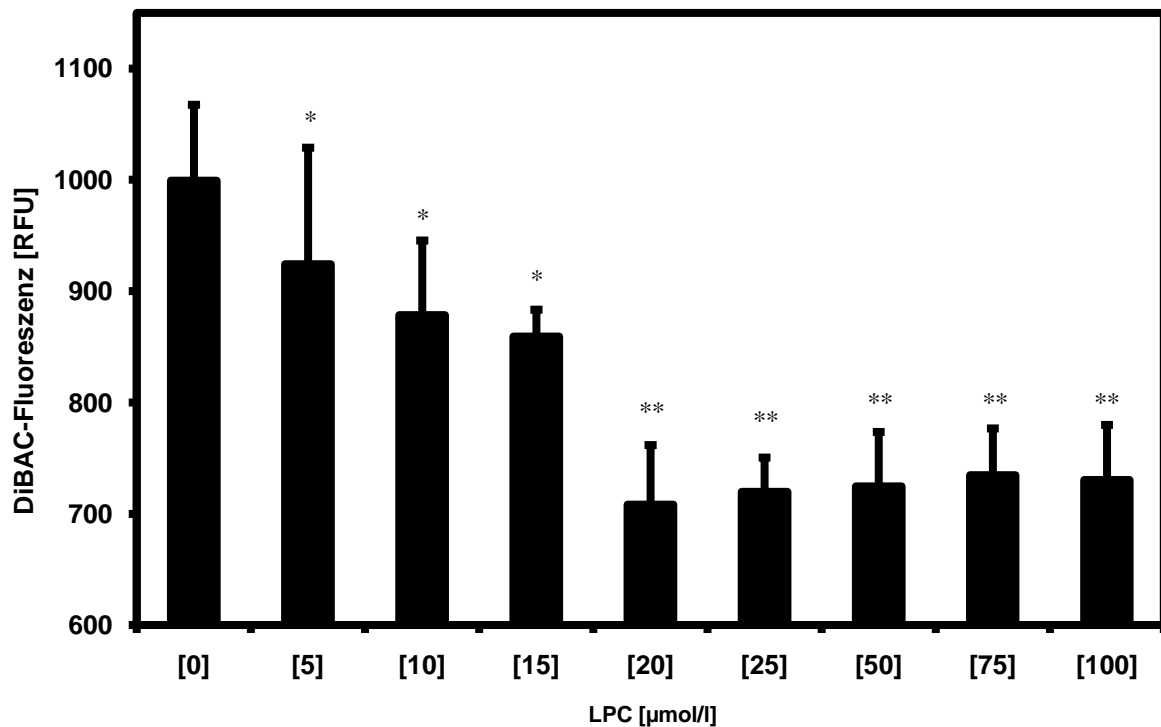


Abb. 1: LPC bewirkt eine konzentrationsabhängige Abnahme der DiBAC-Fluoreszenz mit einem Maximum bei 20 µmol/l. Weitere Konzentrationssteigerungen haben keinen verstärkenden Effekt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM zum Zeitpunkt t=30 min dargestellt.

(*p<0,05 vs. Kontrolle; **p<0,01 vs. Kontrolle; n=20; LPC in µmol/l)

3.1.2 Blockade des BK_{Ca} mit Iberiotoxin

Der Calcium-aktivierte Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit kann durch das Gift des Skorpions *Buthus tamulus* hochselektiv blockiert werden. Iberiotoxin bindet von außen an den Kanal und verschließt diesen. Der Fluss von Kaliumionen durch den Kanal wird dadurch unterbrochen [36].

Um eine Beteiligung des BK_{Ca} an der Änderung des Membranpotentials nachzuweisen, wurden die Endothelzellen mit 20 µmol/l LPC versetzt und mit IBX koinkubiert.

IBX verursachte eine Aufhebung der LPC-induzierten Hyperpolarisation auf Kontrollniveau. Die alleinige Gabe von IBX zeigte keine signifikante Veränderung

Ergebnisse

gegenüber der Kontrolle, wodurch zytotoxische Effekte des IBX ausgeschlossen werden konnten.

Lysophosphatidylcholin beeinflusst das Membranpotential durch Aktivierung des BK_{Ca}

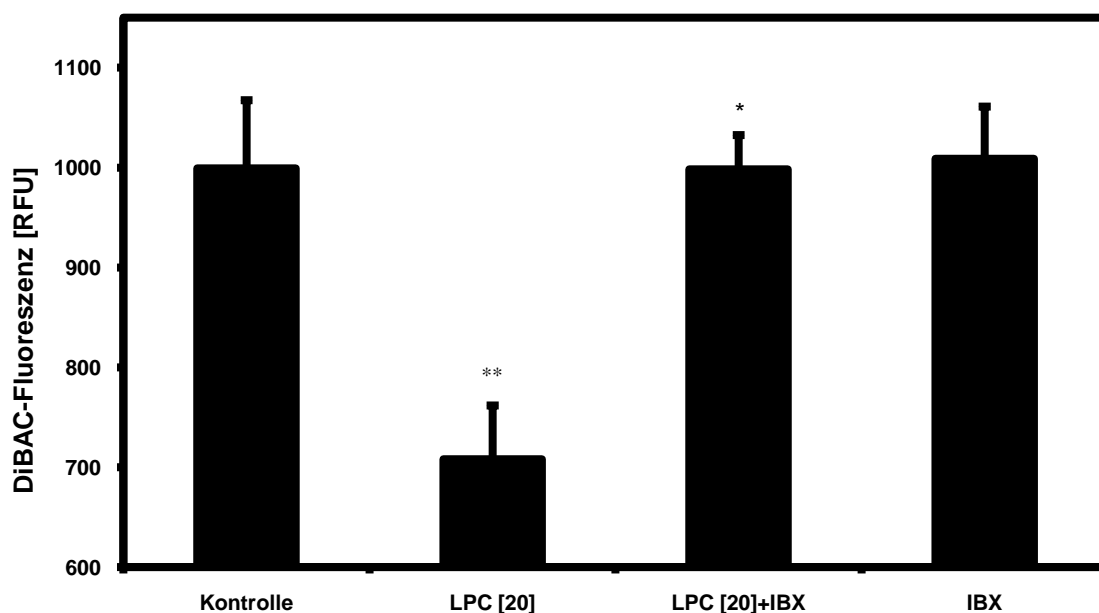


Abb. 2: LPC (20 $\mu\text{mol/l}$) induziert eine signifikante Abnahme der DiBAC-Fluoreszenz. Eine Koinkubation mit Iberiotoxin (IBX100 nmol/l) bewirkt eine Aufhebung der Fluoreszenzabnahme. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle; ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle; $n=20$)

3.2 Adhäsionsversuche

In den Adhäsionsversuchen wurde zunächst untersucht, ob der Adhäsionsprozess primär durch humane Endothelzellen oder U937-Monozyten induziert wird. Es wurde jeweils eine Zeitreihe erstellt um herauszufinden, ob bzw. wann eine signifikante Zunahme der LPC-induzierten Adhäsion auftritt. Dazu wurden zunächst die Monozyten stimuliert und die HUVEC unbehandelt gelassen oder nur die HUVEC inkubiert.

Ergebnisse

Anschließend wurde die Adhäsion noch auf ihre Calcium- und Sauerstoffradikalabhängigkeit untersucht und in diesem Zusammenhang die Beteiligung des BK_{Ca} als regulierendes Element untersucht.

3.2.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Adhäsion

3.2.1.1 Stimulierte U937-Monozyten auf unstimulierten HUVEC

Es wurden U937-Zellen mit 20 $\mu\text{mol/l}$ LPC inkubiert und eine Zeitreihe erstellt. Die Inkubationszeit lag zwischen 0h bis 24h. Dabei zeigte sich keine signifikante Zunahme der Adhäsion ($n=6$, $p=\text{nicht signifikant vs. Kontrolle}$). Daher wurden in den folgenden Adhäsionsversuchen die Monozyten nicht gesondert stimuliert. In Abbildung 3 sind die Ergebnisse zum Zeitpunkt $t=24\text{h}$ dargestellt.

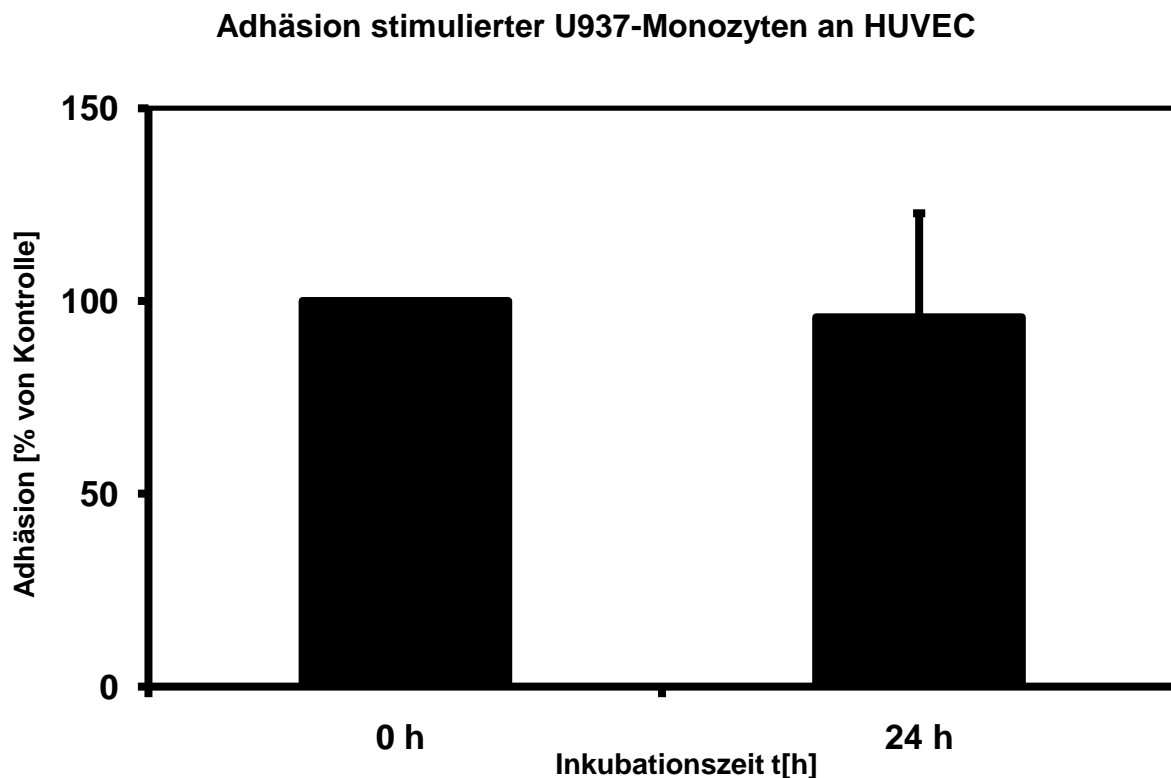


Abb. 3: LPC stimulierte U937-Monozyten haben keinen adhäsiven Effekt auf HUVEC Darstellung zum Zeitpunkt $t=0$ und $t=24\text{h}$. Alle Daten sind als Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ in % der Kontrolle dargestellt.

($p= \text{n.s. vs. Kontrolle}$; $n=6$ Kontrolle entspricht $t=0\text{h}$; LPC 20 $\mu\text{mol/l}$)

3.2.1.2 Stimulierte HUVEC auf unstimulierten U937-Monozyten

Stimulierte HUVEC wurden mit unstimulierten U937-Zellen versetzt und die Adhäsion gemessen. Die Inkubationszeit lag zwischen $t=0\text{h}$ und $t=4\text{h}$. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Adhäsion nach bereits vier Stunden ($n=6$, $p<0,01$ vs. Kontrolle). Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Versuche eine Inkubationszeit von vier Stunden gewählt.

LPC-induzierte Monozytenadhäsion an HUVEC

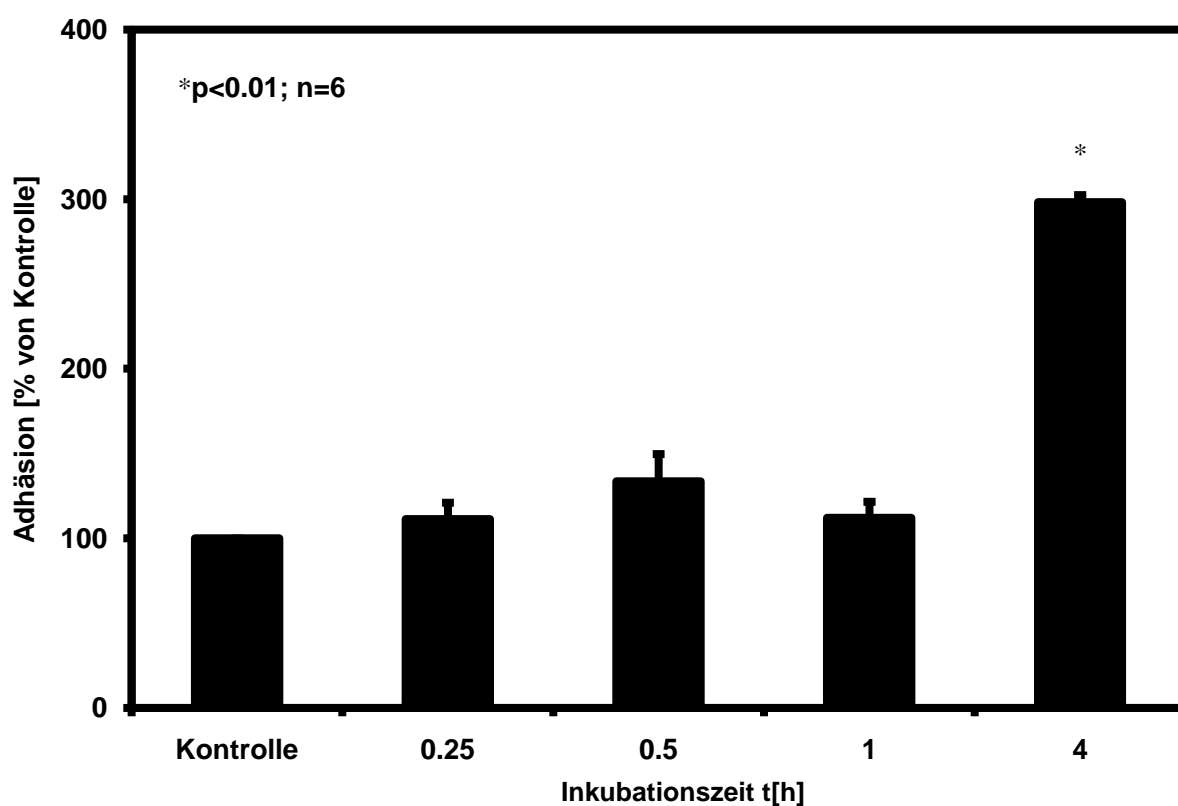


Abb. 4: Adhäsion stimulierter HUVEC (LPC 20 $\mu\text{mol/l}$) an unstimulierten U937-Monozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Signifikante Zunahme der Adhäsion auf 298% der Kontrolle nach $t=4\text{h}$. Alle Daten sind als Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ in % der Kontrolle dargestellt.

(* $p<0,01$ vs. Kontrolle; $n=6$; Kontrolle entspricht $t=0\text{h}$; LPC 20 $\mu\text{mol/l}$)

3.2.2 Einfluss von Calcium auf die Adhäsion

Da der BK_{Ca} in der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase in der Zelle eine entscheidende Rolle spielt, wurde im folgenden Versuch zunächst der Einfluss von Calcium auf die LPC induzierte Adhäsion untersucht. Dazu wurden die HUVEC zunächst mit dem Calciumchelator BAPTA inkubiert. BAPTA bindet intrazelluläres Calcium in Chelatkomplexe, wodurch es der Zelle für Stoffwechselprozesse nicht mehr zur Verfügung steht.

Des Weiteren wurden die Endothelzellen mit 2-APB inkubiert, was den transmembranären Calciumeinstrom in die Zelle blockiert. Mit dieser Untersuchung kann unterschieden werden, ob vornehmlich intra- bzw. extrazelluläres Calcium für die Adhäsion von der Zelle verbraucht wird.

Unter Einfluss des LPC (20 $\mu\text{mol/l}$) kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Adhäsion auf das dreifache gegenüber der Kontrollgruppe. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit BAPTA konnte dieser Effekt signifikant reduziert werden. Bei Inkubation mit LPC+2-APB konnte die Adhäsion gegenüber nur mit LPC stimulierten Endothelzellen ebenfalls signifikant reduziert werden.

BAPTA und 2-APB hatten allein keinen Effekt auf die Adhäsion, wodurch zytotoxische bzw. durch die Inhibitoren induzierte Effekte ausgeschlossen werden konnten. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung graphisch dargestellt.

Einfluss von Calcium auf die Adhäsion von U937-Monozyten an HUVEC

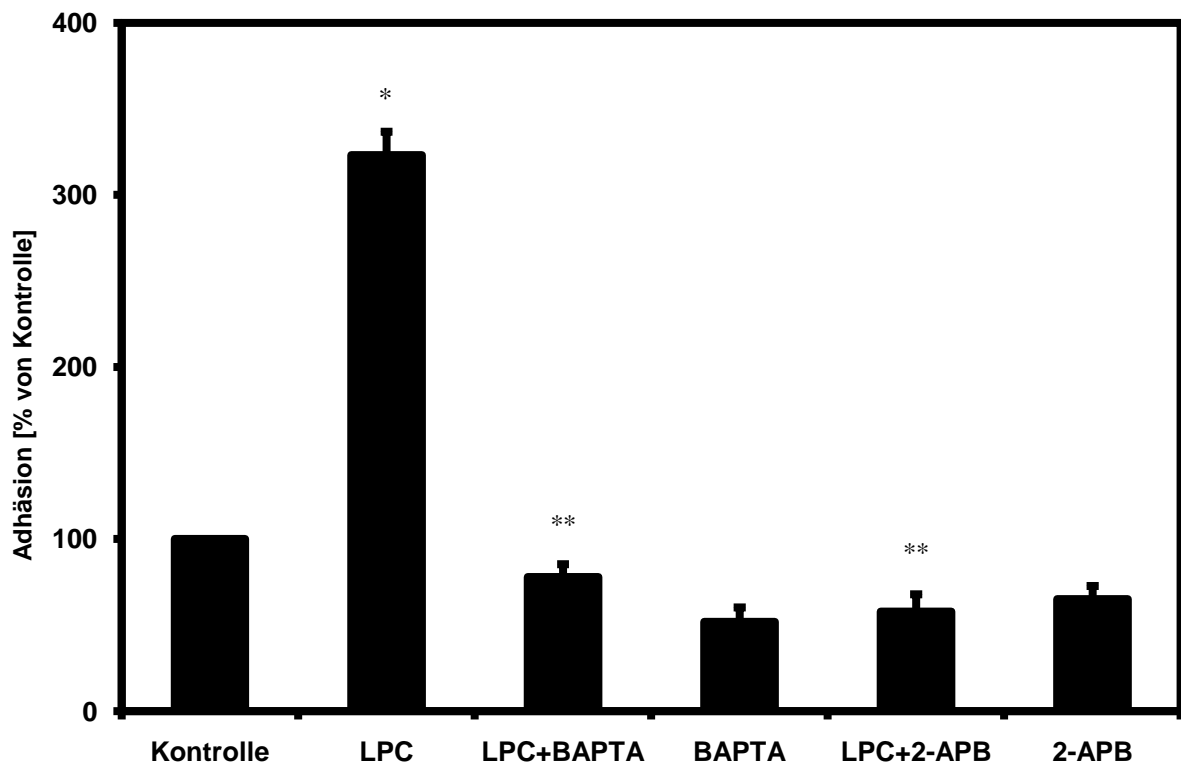


Abb. 5: Die LPC (20 $\mu\text{mol/l}$) induzierte Monozytenadhäsion wird durch Bindung des Calciums (BAPTA 10 $\mu\text{mol/l}$) sowie durch die Blockierung des kapazitiven Einstroms von Calcium in die Zelle (2-APB 100 $\mu\text{mol/l}$) signifikant verhindert. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM in % der Kontrolle dargestellt.

(* $p < 0,01$ vs. Kontrolle; ** $p < 0,01$ vs. LPC; $n=6$)

Die Ergebnisse zeigen, dass eine LPC induzierte Monozytenadhäsion calciumabhängig ist und für diesen Adhäsionsprozess vorrangig extrazelluläres Calcium benötigt wird.

3.2.3 Einfluss von Radikalen auf die Adhäsion

Eine der wichtigsten Möglichkeiten in der Zelle Radikale zu generieren ist die Bildung durch die NADPH-Oxidase. In den Untersuchungen von Kuhlmann et al. konnte bereits gezeigt werden, dass LPC über die NADPH-Oxidase zu einer Radikalbildung

Ergebnisse

in der Zelle führt [97]. Um den Einfluss von Radikalen auf die LPC-induzierte Adhäsion zu untersuchen, wurde die NADPH-Oxidase mit Hilfe des spezifischen Inhibitors DPI gehemmt.

Wie bereits beschrieben, kommt es unter Einfluss von LPC zu einer Adhäsionssteigerung. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit DPI zeigte sich eine signifikante Reduktion der LPC induzierten Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen. Die alleinige Inhibierung der NADPH-Oxidase mit DPI hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion.

Einfluss von Sauerstoffradikalen auf die Adhäsion von U937-Monozyten an HUVEC

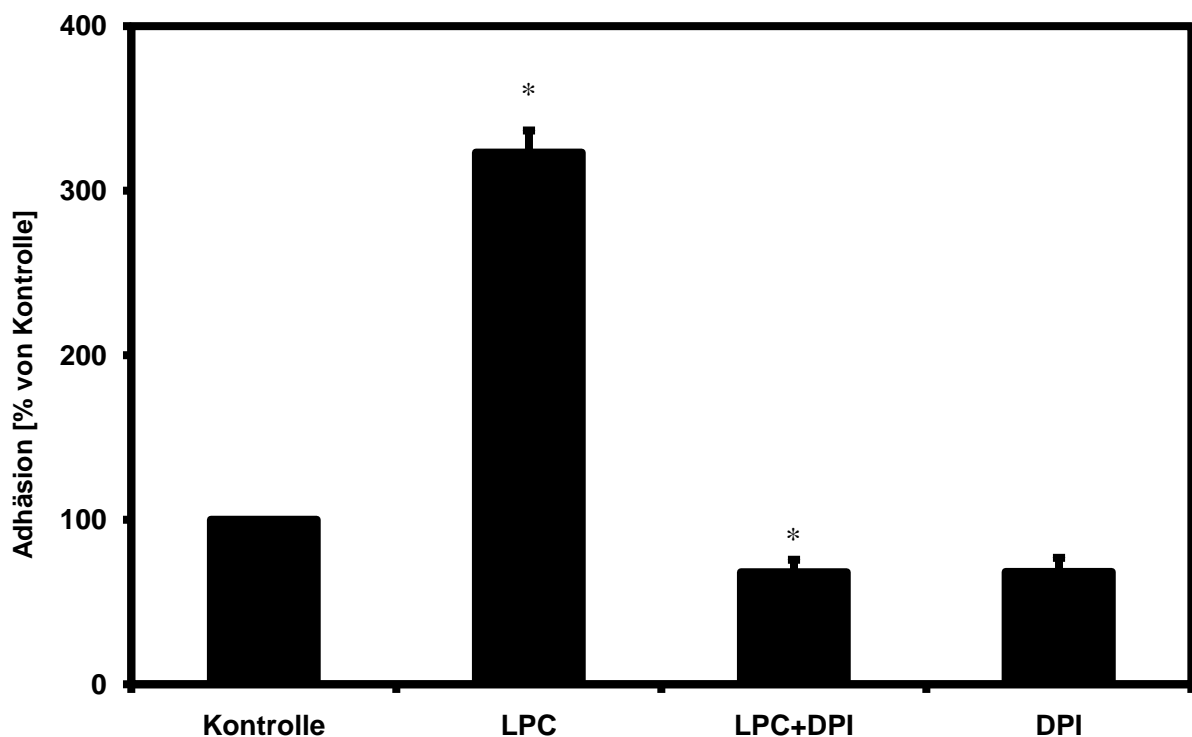


Abb. 6: Die Blockierung der NADPH-Oxidase mit DPI (5 $\mu\text{mol/l}$) verhindert signifikant die LPC (20 $\mu\text{mol/l}$) induzierte Monozytenadhäsion an HUVEC. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM in % der Kontrolle dargestellt.

(* $p < 0,01$ vs. Kontrolle; ** $p < 0,01$ vs. LPC; $n=6$)

Ergebnisse

Die gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass die LPC-induzierte Monozytenadhäsion radikalabhängig ist und über die NADPH-Oxidase vermittelt wird.

3.2.4 Einfluss des BK_{Ca} auf die Adhäsion

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob der BK_{Ca} einen Einfluss auf die Adhäsion hat. Es wurde wie in den vorherigen Adhäsionsversuchen zunächst die Adhäsion mit LPC gesteigert. In einem weiteren Schritt wurde der BK_{Ca} mit Iberiotoxin (IBX) blockiert.

Bei gleichzeitiger Inkubation mit LPC und IBX konnte eine signifikante Abnahme der LPC-induzierten Adhäsion beobachtet werden. Die alleinige Blockierung des BK_{Ca} durch IBX zeigte gegenüber der Kontrolle keine Signifikanz. Dadurch konnte ein zytotoxischer Effekt von IBX ausgeschlossen werden.

.

Einfluss des BK_{Ca} auf die Adhäsion von U937-Monozyten an HUVEC

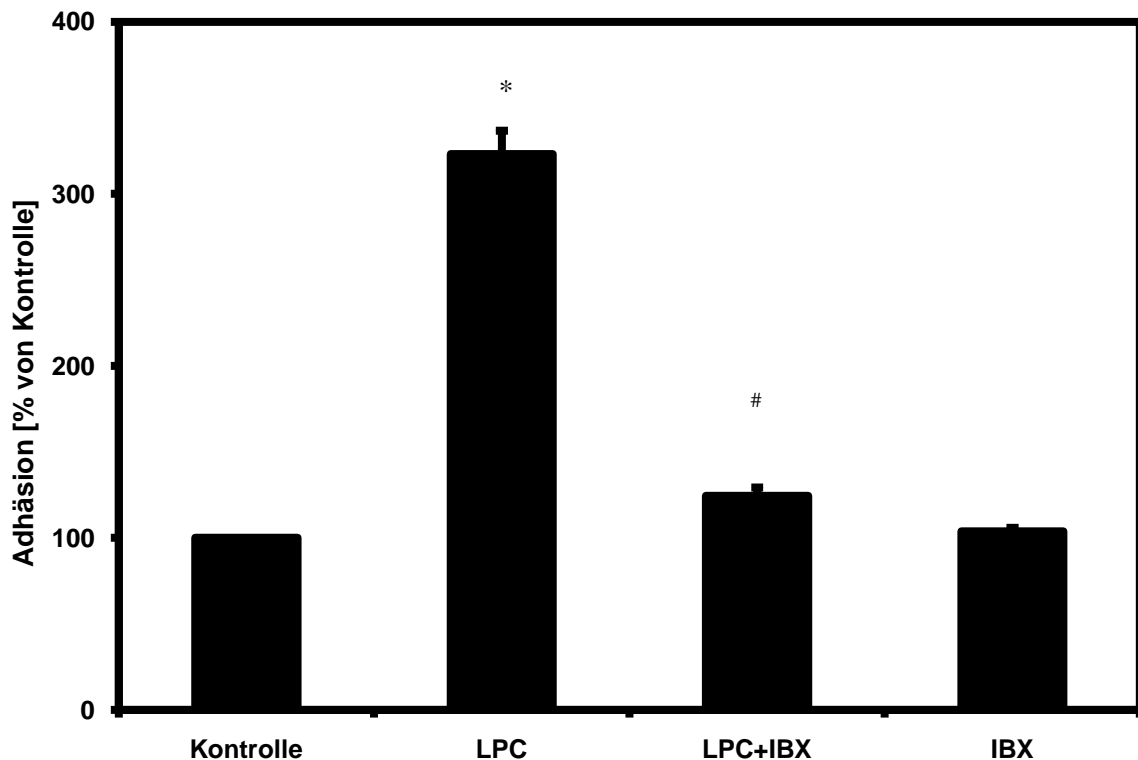


Abb. 7: LPC (20 $\mu\text{mol/l}$) zeigte eine signifikante Steigerung der Adhäsion im Vergleich zu der Kontrolle. Die gleichzeitige Inkubation mit LPC und IBX (IBX 100 nmol/l) bewirkte keine signifikante Adhäsionszunahme. Alle Daten sind als Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ in % der Kontrolle dargestellt.

(* $p < 0,01$ vs. Kontrolle; # $p < 0,01$ vs. LPC; $n=6$)

Die beschriebenen Versuche zeigen erstmals, dass die LPC-induzierte Monozytenadhäsion an HUVEC über einen Kaliumkanal vermittelt wird.

3.3 Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM

In den vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass die LPC-induzierte Adhäsion über den BK_{Ca} vermittelt wird. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Adhäsion calcium- und radikalabhängig ist. Mit dem folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob auch die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM von diesen Faktoren beeinflusst wird.

Ergebnisse

Zunächst wurden die Endothelzellen wie bei den Adhäsionsversuchen für vier Stunden mit 20 $\mu\text{mol/l}$ LPC stimuliert. Zusätzlich wurde jeweils mit IBX der BK_{Ca} blockiert, die NADPH-Oxidase mit DPI gehemmt und mit BAPTA das Calcium der Zelle entfernt.

Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression von ICAM und VCAM unter LPC auf 150,94% für ICAM und auf 151,14% für VCAM. Bei Zugabe von IBX, DPI und BAPTA konnte dieser Effekt jeweils aufgehoben werden.

ICAM- und VCAM-Expression in Abhängigkeit vom BK_{Ca} , Sauerstoffradikalen und Calcium

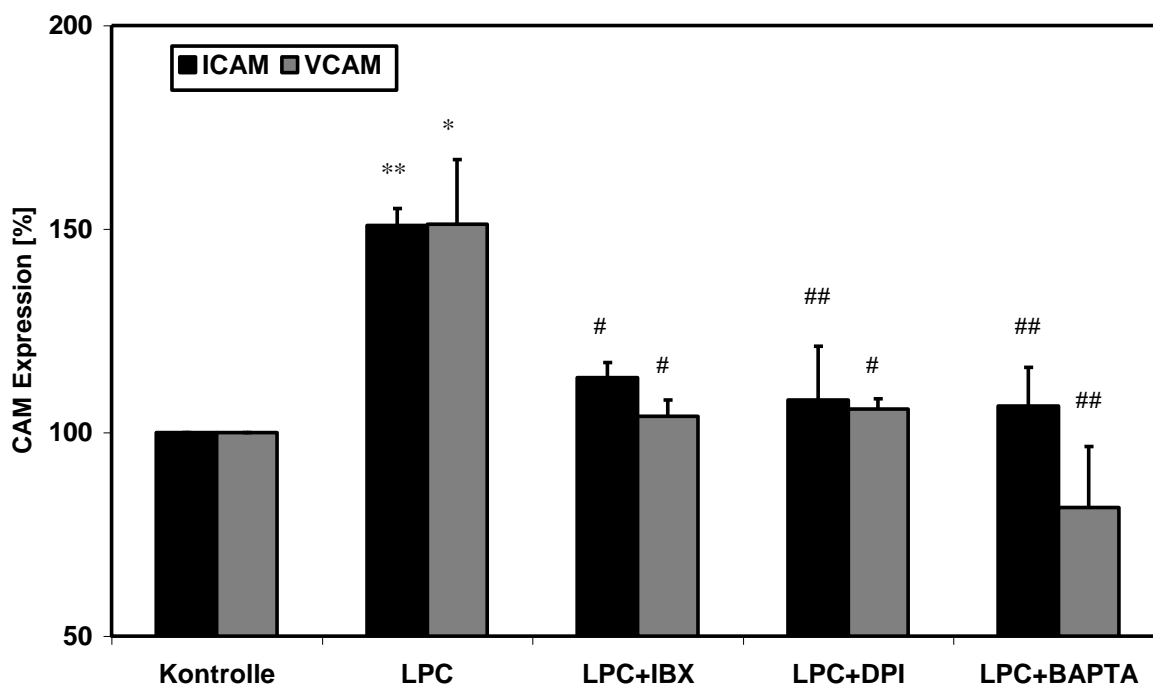


Abb. 8: LPC (20 $\mu\text{mol/l}$) induziert die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM. Iberiotoxin (IBX 100 nmol/l) verhindert signifikant die LPC induzierte Expression von ICAM und VCAM. Durch die Bindung des Calciums (BAPTA 10 $\mu\text{mol/l}$) sowie durch die Blockierung der NADPH-Oxidase (DPI 5 $\mu\text{mol/l}$) wird ebenfalls die LPC induzierte Expression von ICAM und VCAM signifikant verhindert.

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM in % der Kontrolle dargestellt.

(* $p < 0,05$ vs. Kontrolle; ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. LPC; ## $p < 0,01$ vs. LPC; $n=4$)

Ergebnisse

Dieser Versuch zeigt, dass nicht nur die LPC-induzierte Monozytenadhäsion sondern auch die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM calcium- und radikalabhängig sind. Bei der Adhäsion sowie bei der Expression der Adhäsionsmoleküle konnte somit erstmals gezeigt werden, dass diese Effekte durch den BK_{Ca} vermittelt werden.

4. Diskussion

Die Diskussion gliedert sich in vier Abschnitte. In 4.1 wird zunächst der Einfluss des LPC auf den BK_{Ca} diskutiert. Anschließend werden die Auswirkungen der BK_{Ca} -Modulation im Bezug auf die Adhäsion und die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM genauer betrachtet. In Kapitel 4.3 wird die Adhäsion in Abhängigkeit von Calcium und radikalen Sauerstoffspezies näher beleuchtet. Im letzten Abschnitt sollen die gewonnenen Erkenntnisse vor dem dazugehörigen klinischen Hintergrund betrachtet werden.

4.1 BK_{Ca} - Modulation durch Lysophosphatidylcholin

Mit dem von Galvez et al. entdeckten hoch spezifischen Inhibitor des Calcium-aktivierten Kaliumkanals mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}) Iberiotoxin (IBX), ist es möglich, den BK_{Ca} gezielt von anderen Ionenkanälen zu unterscheiden und seine Auswirkungen auf die Zelle genauer zu untersuchen. Des Weiteren ist bekannt, dass Lysophosphatidylcholin (LPC) eine gesteigerte Adhäsion von Monozyten an humanen Endothelzellen bewirkt [12-14, 45,46].

Um die Fragestellung der vorliegenden Arbeit klären zu können, ob der BK_{Ca} durch Lysophosphatidylcholin einen Einfluss auf die Adhäsion bzw. Expression von Adhäsionsmolekülen hat, musste zunächst geklärt werden, ob der BK_{Ca} überhaupt durch LPC moduliert werden kann.

Der BK_{Ca} ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials der Zelle beteiligt. Daher wurde das Membranpotential in Abhängigkeit unterschiedlicher LPC-Konzentrationen gemessen.

Es zeigte sich bei den Membranpotentialmessungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC eine konzentrationsabhängige Abnahme der Fluoreszenz, was einer Hyperpolarisation der Zellmembran entspricht. Diese war bereits bei einer LPC-Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ signifikant und zeigte ihre maximale Ausprägung bei 20 $\mu\text{mol/l}$. Eine weitere Konzentrationssteigerung hatte keinen stärkeren Effekt.

Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Versuche eine Konzentration von 20 $\mu\text{mol/l}$ verwendet. Um die Beteiligung des BK_{Ca} an der LPC induzierten Hyperpolarisation nachzuweisen, wurde der BK_{Ca} mit Iberiotoxin geblockt und

gleichzeitig mit der ermittelten LPC-Konzentration (20 $\mu\text{mol/l}$) stimuliert. Dadurch konnten die zuvor beobachteten Hyperpolarisationseffekte aufgehoben werden.

Die alleinige Stimulation der Zellen mit Iberiotoxin führte zu keiner signifikanten Veränderung der Fluoreszenzintensität. Da Iberiotoxin hochspezifisch nur den BK_{Ca} blockiert, kann daraus geschlossen werden, dass der BK_{Ca} durch LPC aktiviert wird und konzentrationsabhängig zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führt.

Da der Mechanismus der LPC induzierten Hyperpolarisation bisher noch nicht geklärt ist, musste davon ausgegangen werden, dass die LPC induzierte Hyperpolarisation möglicherweise nicht über den BK_{Ca} vermittelt wird sondern auf einer Modulation anderer Ionenkanäle beruht. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch mit Hilfe des Inhibitors IBX eindeutig eine BK_{Ca} vermittelte Hyperpolarisation nachgewiesen werden.

Kuhlmann et al. konnten durch *patch-clamp*-Experimente zeigen, dass LPC und oxLDL den BK_{Ca} direkt aktivieren und dadurch die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöht wird [40-41]. Eine Auswirkung auf das Membranpotential wurde jedoch nicht weiter untersucht und auch der genaue Mechanismus der LPC induzierten BK_{Ca} -Aktivierung bleibt bei Kuhlmann et al. ungeklärt. Für oxLDL ist der Rezeptor LOX-1 identifiziert worden, der das oxLDL in die Zelle aufnimmt. Ob solch ein Rezeptor auch für das LPC existiert oder ob der BK_{Ca} direkt aktiviert wird, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die vorliegenden Resultate sowie die Ergebnisse von Kuhlmann et al. lassen jedoch den Schluss zu, dass der Calcium-aktivierte Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit durch LPC aktiviert wird und dosisabhängig zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führt.

4.2. BK_{Ca} vermittelte Monozytenadhäsion und Expression von ICAM und VCAM

Die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen kann im Rahmen der Arteriosklerose als eine Entzündungsreaktion beschrieben werden [5]. Während des Prozesses der arteriosklerotischen Plaquebildung herrscht in der Zelle ein Überangebot an LPC [10-11]. Durch zahlreiche Veröffentlichungen ist bekannt, dass es durch eine Behandlung von HUVEC mit LPC, oxLDL oder anderweitig oxidierten Lipiden zu einer numerischen Zunahme der Adhäsion bzw. zu einer Zunahme der Adhäsionsstärke von Monozyten kommt [12-14, 45,46]. Daher sollte als nächstes die Frage geklärt werden, ob der BK_{Ca} hierbei einen regulierenden Einfluss hat.

Dass die Expression von Adhäsionsmolekülen durch unterschiedliche Mediatoren ausgelöst werden kann, konnte bereits gezeigt werden. In vivo und in vitro Versuche belegen, dass Cytokine (Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin-1, Interleukin-4 und Interferon- γ), Bakterien Bestandteile (Lipopolysaccharide von *Escherichia coli*) sowie LDL und oxLDL als Stoffwechselprodukte die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle wie ICAM, VCAM, *Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1* (ELAM-1) sowie P- und E-Selektinen fördern [42-44]. Von diesem Hintergrund ausgehend sollte überprüft werden, ob auch LPC in der Zelle als Mediator fungiert und auch die Expression von ICAM und VCAM über den BK_{Ca} steuert.

In der Literatur ist nicht geklärt, ob aktivierte Monozyten oder aktivierte Endothelzellen für die Auslösung der LPC induzierten Adhäsion verantwortlich sind. Daher wurden beide Möglichkeiten getrennt voneinander untersucht.

Zunächst wurde eine Zeitreihe angelegt um den Zeitpunkt einer signifikanten Veränderung der Adhäsion zu ermitteln. In Abbildung 3 ist dargestellt, dass die alleinige Stimulation der Monozyten die Adhäsion an HUVEC nicht steigern konnte. Da es nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zu keinen signifikanten Veränderungen der Adhäsion gekommen war, wurde der Versuch abgebrochen. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte in den nachfolgenden Adhäsionsversuchen auf eine gesonderte Stimulation der U937-Zellen verzichtet werden.

Im Gegensatz dazu konnte, wie in Abbildung 4 dargestellt, bei stimulierten HUVEC bereits nach vier Stunden eine signifikante Zunahme der Adhäsion auf das nahezu dreifache gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Alle weiteren Adhäsionsversuche sowie die durchflusszytometrischen Untersuchungen der

Adhäsionsmolekülexpression wurden daher mit einer Inkubationszeit von vier Stunden durchgeführt. Die Frage ob eine Verlängerung der Inkubationszeit eine vermehrte Adhäsion zur Folge hat, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht und bleibt in diesem Zusammenhang offen. Es lassen sich jedoch in der Literatur mehrere Veröffentlichungen finden, die ebenfalls eine zeitabhängige Expression von Adhäsionsmolekülen nach vier Stunden zeigen konnten. Sie liefern damit eine mögliche Erklärung für die zeitabhängige Adhäsion der vorliegenden Arbeit.

Kume et al. beschrieben eine LPC-induzierte mRNA-Synthese für ICAM nach vier Stunden in Endothelzellen einer Kaninchenaorta [12]. Auch Amberger et al. untersuchten bei HUVEC unterschiedliche Zytokine sowie LDL und oxLDL Partikel als Induktoren von Adhäsionsmolekülen. Sie konnten hierbei für alle verwendeten Stoffe konstant nach vier Stunden eine starke Signalanhebung im *Northern Blot* beobachten und diese durch FACS-Analysen bestätigen [43]. Auch bei Chen et al. wird eine zeitabhängige Expression von Adhäsionsmolekülen unter LPC beschrieben, die sich mit den vorliegenden Ergebnissen vereinbaren lässt [15]. Eine Zunahme dieser Effekte konnte durch längere Inkubationszeiten bei diesen Arbeitsgruppen nicht gezeigt werden. Ob sich diese Ergebnisse der zeitabhängigen Expression von Adhäsionsmolekülen auf die hier untersuchte zelluläre Adhäsion vom Monozyten an Endothelzellen übertragen lassen bleibt offen. Diese Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit mit LPC keine stärkere Adhäsion der U937-Zellen hervorbringen würde.

Im Bezug auf die quantitative Zunahme der Adhäsion lassen sich in der Literatur ebenfalls ähnliche Hinweise finden. In der vorliegenden Arbeit konnte durch LPC eine Zunahme der Adhäsion auf das nahezu dreifache gegenüber der Kontrolle gesteigert werden. Dies deckt sich mit den Veröffentlichungen von Jeng et al. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass es nach einer Stimulation mit oxLDL zu einem 2,2-fachen Anstieg der Adhäsion von Blutmonozyten an HUVEC kam. Dabei stieg in einem simulierten Blutfluss mit der *flow*-Kammer-Technik die Bindungsstärke der Monozyten um das achtfache unter *high shear stress*-Bedingungen an. Die Expression von ICAM erhöhte sich im selben Versuch um den Faktor 2,6 [14].

Die unter 3.2 gezeigten Ergebnisse bestätigen die durch LPC induzierte Steigerung der Monozytenadhäsion an Endothelzellen. In anderen Arbeiten ließ sich der beschriebene Adhäsionseffekt ebenfalls mit unterschiedlichen Endothelzellen sowie verschiedenen Monozyten konstant reproduzieren [12, 14, 15, 43].

Um die Frage zu klären, ob es sich bei der LPC induzierten Adhäsion um einen BK_{Ca} -vermittelten Effekt handelt, wurde in den unter 3.2.4 beschriebenen Versuchen der Kaliumkanal mit dem BK_{Ca} -Inhibitor IBX selektiv geblockt. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der durch LPC verursachten Adhäsion. Die alleinige Inkubation mit IBX hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion, wodurch zytotoxische Effekte ausgeschlossen werden konnten.

Wie bereits beschrieben, kann LPC die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen steigern. Außerdem konnte eine Präinkubation mit dem BK_{Ca} -Inhibitor Iberiotoxin diese Adhäsion verhindern. Dies bedeutet, dass unter Ausschaltung des BK_{Ca} die Adhäsion nicht stattfinden kann. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass die LPC induzierte Adhäsion der U937-Monozyten durch Aktivierung des BK_{Ca} vermittelt wird. Damit konnte erstmals in der Literatur gezeigt werden, dass an der Adhäsion von Monozyten an HUVEC ein Ionenkanal beteiligt ist.

Im Kontrast zu den vorliegenden Adhäsionsversuchen stehen die Untersuchungen von Erl et al. Sie konnten zwar eine Adhäsionszunahme durch oxLDL, nicht jedoch durch LPC zeigen. Außerdem konnten sie nur die Adhäsion der Monozytenzelllinie Mono-Mac-6 steigern. Die Adhäsion von U937-Zellen blieb jedoch mit beiden Stoffen negativ. Eine Erklärung könnte in der unterschiedlichen Konzentration von LPC liegen. Die von Erl et al. verwendeten Zellen wurden mit einer fünffach höheren Konzentration LPC (100 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Des Weiteren führen Erl et al. aus, dass humane Monozyten in vivo sowie Mono-Mac-6-Zellen den ICAM-Gegenrezeptor Mac-1 exprimieren. Dieser Rezeptor kommt durch eine starke Variabilität der Zellklone unterschiedlich stark zur Expression bzw. kann bei U937-Zellen vollkommen fehlen. Erl et al. führen dies als Grund an, weshalb es nicht zu einer Adhäsion von U937-Zellen an HUVEC kommt [47].

In der vorliegenden Arbeit konnte eine alleinige Stimulation der Monozyten mit LPC die Adhäsion an HUVEC nach 24 Stunden nicht steigern (Versuch 3.2.1.1). Frostegard et al. demonstrierten hingegen, dass eine Präinkubation von U937-Monozyten mit oxLDL die Adhäsion steigert. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz könnte in einer weitaus höheren Präinkubationszeit von 48 Stunden liegen. Es ist ebenfalls denkbar, dass andere Bestandteile des oxLDL für die verstärkte Adhäsion verantwortlich sind. In nachfolgenden Arbeiten postulierten Forstegard et al., dass eine Stimulation von Endothelzellen mit Nährmedium, in dem zuvor mit oxLDL behandelten U937-Zellen inkubiert waren, zu einer verstärkten

Adhäsion sowie einer Expressionszunahme von ICAM, VCAM, E-Selektin und ELAM auf Endothelzellen zu beobachten war. Sie vermuteten eine Sekretion von einem bzw. mehreren Faktoren, die wie Zytokine wirken und in der Lage sind, weitere Monozyten zu rekrutieren und eine Expression von Adhäsionsmolekülen hervorzurufen [48, 49]. Diese vermeintlich gegensätzlichen Ergebnisse zeigen, dass die Kommunikation der Zellen im Rahmen der Arteriosklerose noch nicht eindeutig geklärt ist. Obwohl die Stimulation der Monozyten in den vorliegenden Versuchen keinen adhäsionssteigernden Effekt hatte, kann jedoch eine gegenseitige Beeinflussung der Zellen im Sinne eines *Feed-Back-Mechanismus* nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da in dieser Arbeit lediglich der Zeitpunkt der frühen Arterioskleroseentstehung betrachtet wurde. Ob die adhäsionssteigernden Effekte durch Monozyten zu einem späteren Zeitpunkt der Arteriosklerose, z.B. im Rahmen der Schaumzellbildung, stärker zum Tragen kommen ist ungeklärt.

Wie bereits dargestellt, lassen sich die hier vorliegenden Ergebnisse der Adhäsionsversuche durch zahlreiche Beobachtungen anderer Autoren bestätigen [12-14, 45-46, 50]. Da einer Adhäsion zunächst immer die Bildung von Adhäsionsmolekülen vorausgeht, sollten die Ergebnisse der zellulären Adhäsion auf molekularer Ebene bestätigt werden. Es wurde dazu die LPC induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM im FACS-Scan gemessen. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen in Abschnitt 3.3 zeigten hier einen Zuwachs der Adhäsionsmolekülexpression ICAM und VCAM um bis zu 50% gegenüber der Kontrolle. Ähnliche Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen kommen zu vergleichbaren Resultaten [12-15]. Um zu untersuchen, ob die gezeigten LPC-Effekte über den BK_{Ca} vermittelt werden, wurde in weiteren Expressionsversuchen der Kaliumkanal wiederum mit Iberiotoxin spezifisch geblockt.

Durch Inkubation der HUVEC mit IBX konnte die LPC-induzierte ICAM- und VCAM-Expression verhindert werden. Die alleinige Inkubation der Zellen mit Iberiotoxin zeigte keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle, wodurch auch hier zytotoxische Effekte ausgeschlossen werden konnten. Es kann daraus geschlossen werden, dass sowohl die LPC induzierte Adhäsion der U937-Monozyten an HUVEC als auch die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM maßgeblich über den BK_{Ca} zeitabhängig vermittelt wird. Eine Präinkubation der HUVEC mit IBX kann somit nicht nur die LPC induzierte Hyperpolarisation der Zellmembran vermindern sondern ebenso die Adhäsion und die Expression der

Diskussion

Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM unterdrücken. Wie bereits erwähnt zeigen die Resultate nicht nur, dass die Adhäsion von Monozyten an HUVEC durch einen Kaliumkanal reguliert wird sondern es konnte auch erstmals in der Literatur die Beteiligung dieses Kanals bei der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM nachgewiesen werden.

4.3 Die Adhäsion in Abhängigkeit von Calcium und radikalen Sauerstoffspezies

Der Calcium-aktivierte Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit reguliert nicht nur das Membranpotential, sondern trägt auch maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase der Zelle bei. Wird der BK_{Ca} durch Änderungen der Membranspannung oder durch Calcium aktiviert, führt dies zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals, gefolgt von einem starken Kaliumausstrom aus der Zelle. Die resultierende Membranhyperpolarisation erhöht den elektrochemischen Gradienten für Calcium und führt dadurch zu einem Calciumeinstrom in die Zelle.

Wie bereits erwähnt können LPC und oxLDL den BK_{Ca} direkt aktivieren und damit einen intrazellulären Calciumanstieg bewirken. Eine Aktivierung des BK_{Ca} durch den Kaliumkanalöffner NS1619 führt ebenfalls zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des BK_{Ca} mit Calciuminflux in die Zelle. Die erhöhten Calciumkonzentrationen wirken hier als *second messenger* und phosphorylieren unter anderem die p42/44-MAP-Kinase (*Mitogen Activated Protein-Kinase*). Durch diese Veränderung werden intrazellulär vermehrt Sauerstoffradikale (ROS) gebildet und gleichzeitig die NO-Synthese reduziert. Außerdem induzieren sie unter anderem die Proliferation von Endothelzellen [51]. Eine oxLDL oder Tumornekrosefaktor- α (TNF α) induzierte Bildung von ROS führt wiederum über eine verstärkte *Nuclear Factor* κ B (NF- κ B) Aktivität zu einer Induktion der Oberflächenmoleküle ICAM und VCAM [52-55]. Es steht fest, dass LPC den BK_{Ca} aktivieren kann und zu einem intrazellulären Calciumanstieg sowie vermehrter ROS Produktion führt. Des Weiteren induziert die zelluläre Belastung mit radikalen Sauerstoffspezies die Expression von ICAM und VCAM. In dieser Arbeit wurde bereits dargelegt, dass die Adhäsion sowie die Expression von ICAM und VCAM über den BK_{Ca} vermittelt wird. Die einzelnen Untersuchungen ließen daher vermuten, dass auch die LPC induzierte Adhäsion sowie die Expression von ICAM und VCAM ebenfalls Calcium- und Radikalabhängig sind und letztlich eine Modulation des BK_{Ca} diese Stoffwechselwege beeinflussen kann. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde zunächst die monozytäre Adhäsion auf ihre Calciumabhängigkeit untersucht.

In der Zelle kann es im Wesentlichen durch zwei Mechanismen zu einem intrazellulären Calciumanstieg kommen. Eine Liberation aus dem endoplasmatischen Retikulum führt zu einem schnellen Anstieg des intrazellulären

Calciums. Wohingegen der BK_{Ca} durch Hyperpolarisation den elektrochemischen Gradienten für Calcium erhöht und dadurch den langsamen transmembranären Calciuminflux verstärkt.

Es wurde daher zunächst mit dem Calciumchelator BAPTA intrazelluläres Calcium in Chelatkomplexe fest gebunden. Somit steht der Zelle kein Calcium mehr für die weitere Signaltransduktion als *second messenger* bzw. für weitere Stoffwechselwege zur Verfügung. Um eine Aussage über den Ursprung des Calciums im Rahmen der Adhäsion treffen zu können, wurde der transmembranäre Zustrom durch 2-APB selektiv geblockt.

Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, zeigt sich unter LPC eine Zunahme der Adhärenz der Monozyten gegenüber der Kontrolle. Durch Koinkubation mit BAPTA konnte die Monozytenadhäsion signifikant reduziert werden (Abschnitt 3.2.2).

Eine Inhibierung der Calciumkanäle durch 2-APB vermochte ebenso die LPC induzierte Adhäsion zu unterbinden wie zuvor das BAPTA. Die alleinige Inkubation der HUVEC mit BAPTA oder 2-APB zeigte keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe. Damit konnte eine Verminderung der monozytären Bindung an HUVEC auf Grund von zytotoxischen Eigenschaften der Inhibitoren ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass für den Prozess der monozytären Adhäsion im Rahmen der Arteriosklerose Calcium benötigt wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion auch nicht stattfinden kann, wenn nur der transmembranäre Calciuminflux in die Zelle blockiert wird. Dies weist darauf hin, dass die HUVEC für eine Adhäsion von U937-Monozyten auf den Zustrom von extrazellulärem Calcium angewiesen sind. Die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum scheint hierbei eine untergeordnete Rolle zu spielen. Da die Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum in der 2-APB-Gruppe nicht blockiert ist, wäre hierbei eine deutlichere Zunahme der Adhäsion gegenüber der BAPTA-Gruppe zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse in BAPTA-Lösung nehmen jedoch gegenüber denen der 2-APB-Gruppe vergleichbare Werte an. Das bedeutet, dass der transmembranäre Zufluss von Calcium die treibende Kraft für die intrazelluläre Calciumerhöhung im Rahmen der LPC induzierten Adhäsion zu sein scheint.

Diese Schlussfolgerungen werden durch die Untersuchungen von Kuhlmann et al. dahingehend gestützt, dass sie in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nach Aktivierung des BK_{Ca} mit LPC und oxLDL jeweils zunächst einen schnellen, steilen

Calciumpeak beobachteten, der von einem langsamen intrazellulären Calciumanstieg gefolgt wurde. Auch sie vermuteten eine Freisetzung des Calciums zunächst aus dem endoplasmatischen Retikulum mit Änderung des elektrochemischen Gradienten und konsekutivem Calciumeinstrom über transmembranäre Kanäle.

Die gewonnenen Erkenntnisse der Adhäsionsversuche konnten anschließend auch auf molekularer Ebene durch die FACS-Scan-Analyse bestätigt werden. Aus versuchstechnischen Gründen wurde hierbei auf eine Unterscheidung zwischen intra- und extrazellulärer Calciumgenese verzichtet und das Calcium lediglich mit BAPTA gebunden. Wie bereits dargestellt konnte eine Inkubation mit LPC die Expression von ICAM und VCAM signifikant steigern. In Abwesenheit des Calciums kam es auch in den FACS-Analysen zu einer signifikanten Reduktion der ICAM und VCAM Expression. In den Arbeiten von Quinlan et al. konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und einer erhöhten Expression von ICAM und VCAM gezeigt werden. Hierbei wird die Expression durch eine verstärkte Bindungsaktivität von NF- κ B und NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*) vermittelt. Quinlans Model betrachtet dabei jedoch die Substanz P vermittelte Entzündungsreaktion von mikrovaskulären Endothelzellen der Haut [56]. Untersuchungen von Wang et al. zeigen, dass auch in HUVEC die CAM-Expression calciumabhängig ist und postulieren eine Beteiligung der p38-MAP-Kinase und der *Extracellular Signal Regulated 1/2-Kinase* (ERK 1/2) [57].

Die Blockierung des kapazitiven Calciumeinstroms durch 2-APB konnte die Adhäsion der Monozyten in Versuch 3.2.2 signifikant verhindern. Das weist darauf hin, dass die HUVEC für eine Adhäsion von U937-Monozyten auf den Zustrom von extrazellulärem Calcium angewiesen sind. Im Gegensatz dazu führten Chen et al. die CAM- und Selektinexpression in HUVEC auf die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum zurück. In ihrem Versuchsaufbau konnten sie in HUVEC auch in einem calciumfreien Medium einen Calciumanstieg mit konsekutiver Steigerung der Adhäsionsmoleküle nachweisen. Erst die Blockierung der Calciumkanäle des endoplasmatischen Retikulums führte zu einer verminderten Expression von VCAM und E-Selectin [58].

Es scheint ein Zusammenhang zwischen einer intrazellulären Calciumerhöhung und der Expression von Oberflächenmolekülen in Endothelzellen zu bestehen [56-58].

Auch im Rahmen der Arteriosklerose lässt sich dieser Zusammenhang *in vitro* und *in vivo* bestätigen [59,60]. Diese Untersuchungen sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen folgenden Schluss zu: Der BK_{Ca} kann durch LPC aktiviert werden und erhöht über eine Membranhypolarisation den elektrochemischen Gradienten für Calcium. Dies führt der Zelle über transmembranäre Kanäle Calcium zu, welches für die Expression von ICAM und VCAM sowie für den Adhäsionsprozess benötigt wird.

Dass Calcium für die Adhäsion bzw. für die CAM-Expression essentiell ist, ist in der Literatur unbestritten. Die zum Teil stark voneinander abweichenden Theorien zur intrazellulären Signaltransduktion zeigen jedoch, dass die genaue Signalkaskade des Calciums im Rahmen des Adhäsionsprozesses bei HUVEC noch weitgehend ungeklärt ist.

Eine Möglichkeit der intrazellulären Informationsweitergabe in HUVEC besteht in der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dieser oxidative Stress veranlasst die Endothelzellen vermehrt Adhäsionsmoleküle zu exprimieren [52-54, 61-63]. Da LPC sowohl ein Induktor der Adhäsionsmolekülexpression als auch ein Aktivator der Adhäsion an sich ist, sollte die Hypothese überprüft werden, ob auch diese beiden Prozesse von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies abhängig sind.

Endothelzellen sind in der Lage auf unterschiedlichem Wege intrazelluläre ROS zu bilden. Da andere Arbeitsgruppen eine LPC induzierte und BK_{Ca} -vermittelte Radikalbildung über die Xanthinoxidase, die Cyclooxygenase, als auch die eNOS, ausschließen konnten, wurde in Versuch 3.2.3 nur die NADPH-Oxidase-vermittelte Radikalbildung näher untersucht [51,97]. Daher wurde in dieser Arbeit die Bildung von Sauerstoffradikalen mit dem NADPH-Inhibitor DPI unterbunden und die Auswirkungen der LPC induzierten Adhäsion und Expression von ICAM und VCAM näher untersucht. In Versuch 3.2.3 zeigte sich nach Ausschaltung der NADPH-Oxidase eine signifikante Abnahme der monozytären Adhäsion gegenüber alleiniger Inkubation mit LPC. Um eine Zytotoxizität durch DPI auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich nur mit DPI beladen und mit der Kontrolle verglichen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Auf molekularer Ebene konnte ebenfalls die LPC induzierte Expression von ICAM und VCAM durch Hemmung der ROS-Bildung signifikant gesenkt werden.

In der Literatur sind zahlreiche Hinweise zu finden, dass eine ROS-Bildung *via* NADPH-Oxidase im Rahmen der Arteriosklerose mit einer verstärkten Expression

von Adhäsionsmolekülen einhergeht. Die Radikalbildung induziert hierbei eine vermehrte NF- κ B Aktivität, die letztlich dadurch die Molekülexpression vermittelt [52-54,61-63]. Ein direkter Zusammenhang zwischen der LPC induzierten Aktivierung des BK_{Ca} und der ROS-Bildung bzw. der NF- κ B Aktivität ist bisher noch nicht untersucht worden. Es gibt jedoch Untersuchungen, die eine Anhäufung von ROS in HUVEC nach Aktivierung des BK_{Ca} mit LPC bzw. dem Kaliumkanalöffner NS1619 nachweisen konnten [40, 51]. Daher ist davon auszugehen, dass letztlich auch die LPC induzierte Aktivierung des BK_{Ca} mit anschließender ICAM und VCAM Expression über den NF- κ B vermittelt wird. In wieweit das nach intrazellulär strömende Calcium als Folge der BK_{Ca} Aktivierung hierbei direkten Einfluss auf die ROS-Bildung bzw. NF- κ B Aktivität nimmt ist unklar und muss Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

Abbildung 9 zeigt eine schematische Zusammenfassung der gewonnenen Ergebnisse: Der Calcium-aktivierte Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit wird durch Lysophosphatidylcholin aktiviert und führt zu einer konzentrationsabhängigen Hyperpolarisation der HUVEC. Diese Spannungsänderung der Zellmembran erhöht den elektrochemischen Gradienten für Calcium und verstärkt den BK_{Ca} in seiner Aktivität. In Folge dessen strömt vermehrt Calcium über transmembranäre Kanäle in die Zelle und bewirkt einen intrazellulären Konzentrationsanstieg. Das Calcium wirkt hier wahrscheinlich als *second messenger* und verändert die NADPH-Oxidase sowie NF- κ B in ihrer Aktivität. Der genaue Mechanismus der Aktivitätsänderung bleibt hierbei jedoch unklar. In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, dass reaktive Sauerstoffspezies und NF- κ B eine Expression von Adhäsionsmolekülen induzieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung der NADPH-Oxidase sowie die Blockierung des Calciums als *second messenger* die Expression von ICAM und VCAM und die Adhäsion von U937-Zellen an HUVEC unterdrücken. Eine selektive Blockade des BK_{Ca} durch den hochspezifischen Inhibitor Iberiotoxin kann die zeitabhängige Adhäsion und Bildung von ICAM und VCAM signifikant verhindern. Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass eine Blockierung des BK_{Ca} den intrazellulären Calciumanstieg und die ROS-Bildung direkt verhindert [51].

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit findet sich der dargestellte Signaltransduktionsweg auch in den Beschreibungen von Ou et al. Sie zeigten ebenfalls an HUVEC den Zusammenhang zwischen einer oxLDL Aktivierung und

dem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration auf. Die sich hier anschließende ROS-Bildung führt auch bei Ou et al. zur Expression von ICAM und VCAM [64].

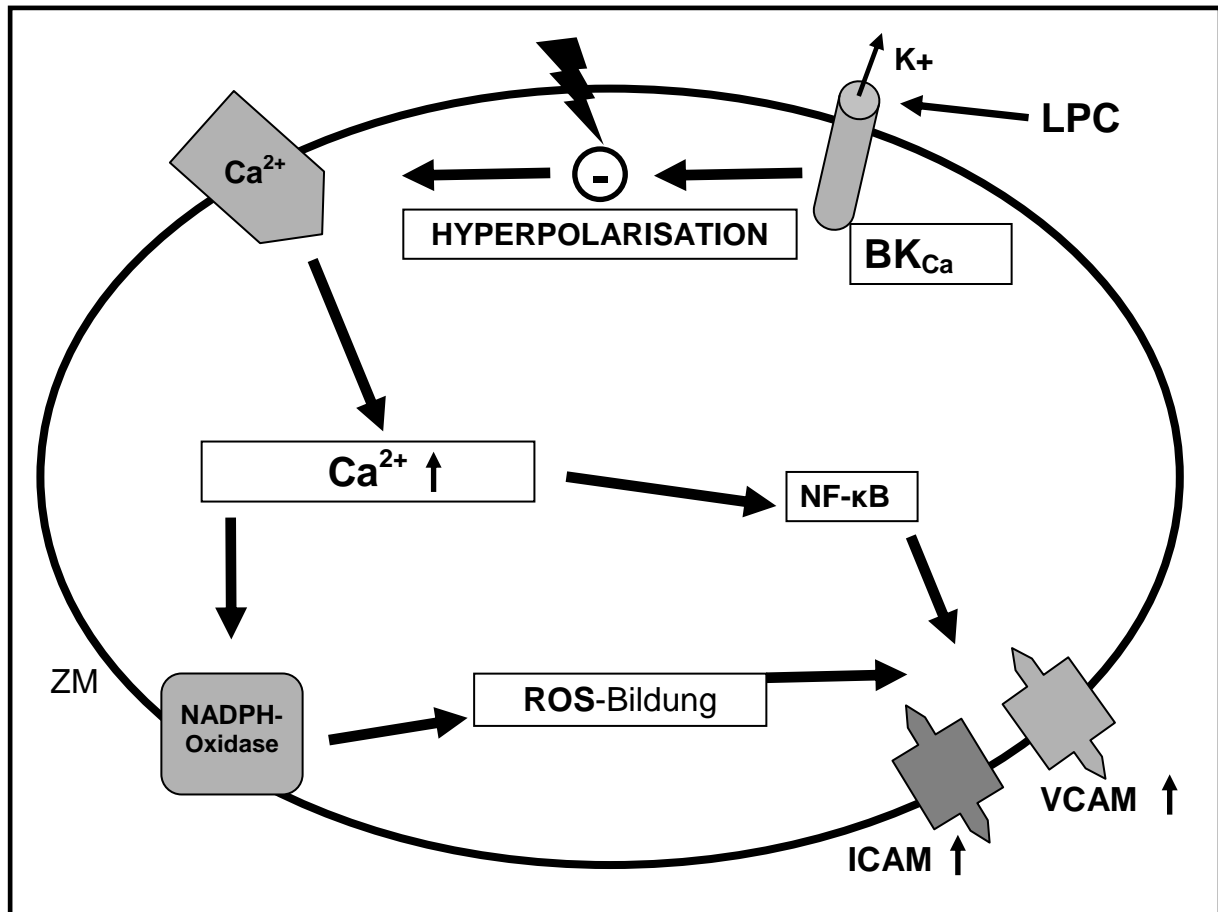


Abb. 9: Schematische Darstellung des LPC induzierten Signaltransduktionsweges in HUVEC; Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit (BK_{Ca}); Kalium (K⁺); Lysophosphatidylcholin (LPC); *Reactiv Oxygen Species* (ROS); *Nuclear Factor κB* (NF-κB); *Inter cellular Adhesion Molecule* (ICAM); *Vascular Adhesion Molecule* (VCAM); Zellmembran (ZM).

Zusammenfassend kann folgendes Fazit gezogen werden:

Der BK_{Ca} nimmt durch die LPC induzierte Aktivierung direkten Einfluss auf die Calciumhomöostase, die ROS-Bildung, die Expression von ICAM und VCAM sowie letztlich die Adhäsion von U937-Monozyten an HUVEC. Iberiotoxin kann durch die Blockade des BK_{Ca} die nachgewiesenen Effekte wirkungsvoll verhindern. Es konnte damit erstmals in der Literatur gezeigt werden, dass an der Expression von ICAM und VCAM sowie der Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen im Rahmen der frühen Arterioskleroseentstehung ein Ionenkanal regulierend Einfluss nimmt.

4.4 Betrachtung der Ergebnisse unter klinischen Gesichtspunkten

Abschließend soll die klinische Relevanz der gezeigten Ergebnisse unter besonderer Berücksichtigung der Arterioskleroseentstehung diskutiert werden.

Als Risikofaktoren für die Entstehung von Herz-Kreislauf-erkrankungen als Folge einer bestehenden Arteriosklerose gelten Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie, Nikotinkonsum und Adipositas [65-67]. Diese Risikofaktoren gehören zu den häufigsten Diagnosen niedergelassener Allgemeinmediziner und Internisten in Deutschland. Im Jahr 2005 erkrankten ca. 5% der Bevölkerung in Deutschland an einem Diabetes mellitus, fast 60% der Männer und ca. 30% der Frauen waren adipös und 27,2% der Bevölkerung gaben an Nikotin zu konsumieren. Dies macht verständlich, weshalb Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die Todesursachenstatistik seit Jahrzehnten dominieren [68,69]. Aus diesem Grund spielt die Aufklärung der pathophysiologischen Zusammenhänge für die Therapie der Arteriosklerose eine wichtige Rolle.

Im Rahmen klinischer Studien wurden die Auswirkungen von einzelnen Risikofaktoren auf das Endothel genauer untersucht. Es zeigte sich bei Patienten mit Hypercholesterinämie eine verschlechterte Vasodilatation auf Stickstoffmonoxid (NO), verdickte Arterienwände, eine verstärkte Bildung radikaler Sauerstoff Species sowie eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen als Zeichen einer endothelialen Dysfunktion [70-73]. Bei Diabetikern führen die *Advanced Glycation End products* (AGEs) zu einer verstärkten Oxidierung von LDL mit induzierter ROS-Bildung. Diese wiederum erhöhen die ICAM und VCAM-Expression und können die Arteriosklerose stark beschleunigen [74]. Eine Belastung des Endothels mit Nikotin vermag ebenfalls über einen calciumabhängigen Signalweg eine Erhöhung der zellulären Adhäsion zu bewirken [57].

Folglich kann man aus den allgemeinen Risikofaktoren für Gefäßkrankheiten „zelluläre Risikofaktoren“ ableiten, die im Rahmen der frühen Arteriosklerose eine Rolle spielen.

Die wichtigsten Faktoren dabei sind die intrazelluläre Calciumkonzentration, die ROS-Bildung und die Expression von Adhäsionsmolekülen. LPC ist ein starker Induktor dieser „zellulären Risikofaktoren“ [75]. Es übernimmt damit, wie in dieser Arbeit gezeigt, nicht nur eine Mediatorfunktion sondern vermag auch die Belastung des Endothels mit oxLDL in der frühen Arteriosklerose zu imitieren.

Da die klinisch fassbaren Risikofaktoren meist durch einen spezifischen Verhaltens- und Lebensstil bedingt sind, sollte dessen Veränderung vorrangig das Ziel einer Therapie darstellen. So kann beispielsweise eine Ernährungsumstellung die endotheliale Dysfunktion verbessern. Eine verstärkte Aufnahme von Flavonoiden, die vor allem in Rotwein, Gemüse und Früchten enthaltenen sind, hat hierbei einen positiven Effekt bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit [76-80].

Eine weitere Therapieoption besteht in der pharmakologischen Modifizierung intrazellulärer Signalkaskaden. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, scheinen die intrazelluläre Calciumkonzentration, die ROS-Bildung und die Expression der Adhäsionsmoleküle als pharmakologische Angriffspunkte geeignet zu sein. So zeigen Untersuchungen, dass eine Reduktion des intrazellulären Calciums durch den Calciumkanalblocker Benidipine die NF- κ B vermittelte Expression von ICAM und VCAM verhindern kann [81]. Klinisch konnte bei Hypertonikern mit gleicher Substanz neben der Senkung des Blutdrucks auch eine Verminderung der P- und E-Selektine beobachtet werden. ICAM und VCAM veränderten sich hierbei nicht signifikant [82].

Der zweite pharmakologische Angriffspunkt in der Therapie der frühen Arteriosklerose besteht in der Inhibierung der ROS-Bildung. Für die Reduktion des oxidativen Stresses finden sich in der Literatur unzählige unterschiedliche Substanzen, die geeignet zu sein scheinen. Die wichtigsten hierbei sind antioxidativ wirkende Pflanzenextrakte, Vitamine und die zur Therapie von hypercholesterinämischen Patienten eingesetzten Hydroxy-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Hemmer (HMG-CoA-Reduktase-Hemmer) [64, 83-86].

Der Konsum von grünem Tee kann beispielsweise bei Rauchern den oxidativen Stress verringern und zu einer Verbesserung der endothelialen Dysfunktion beitragen [83]. Eugenol, ein Inhaltsstoff der in vielen aromatischen Pflanzen vorkommt, vermag in HUVEC nicht nur das intrazelluläre Calcium zu senken, sondern ebenso als „Radikalfänger“ zu fungieren und damit die Expression von ICAM und VCAM zu verhindern [64]. Das sehr potente Vitamin C und α -Tocopherol (Vitamin E) zeigen in klinischen Untersuchungen und Zellstudien einen antioxidativen Effekt und können ebenfalls die Adhäsionsmolekülexpression senken [84-86]. In der heutigen Zeit nehmen jedoch aus pharmakologischer Sicht die HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (Statine) in der Therapie der Arteriosklerose den wichtigsten Stellenwert ein.

Es zeigte sich in großen Multicenter Studien, dass Patienten mit Risikofaktoren durch die Einnahme von Statinen einen deutlichen Überlebensvorteil haben. In der Primär- und Sekundärprävention senken Statine stark das Risiko an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben (HPS Studie 2002; ASCOT-ALL Studie 2003) [87,88].

Oxidativer Stress kann in Endothelzellen zu einer erhöhten Adhäsion von Monozyten führen, den Zelltod (Apoptose) induzieren und eine Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bewirken. Außerdem kann das von der NADPH-Oxidase gebildete Sauerstoffsuperoxid als freies Radikal eine Verbindung mit NO eingehen und damit die Bioverfügbarkeit des vasoprotektiven Stickstoffmonoxid (NO) vermindern. Dies vermindert die Gefäßrelaxation und verschlechtert die endotheliale Funktion. Neben der Senkung des Serumcholesterins können Statine diese oxidativen Prozesse verhindern, eine vermehrte Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) induzieren und somit der Arterioskleroseentstehung entgegenwirken [89-91]. Klinisch drückt sich dieser antioxidative Effekt durch die verminderte oxidative Veränderung von LDL und in einer verbesserten Durchblutung aus [92].

Yokoyama et al. konnten eine LPC induzierte Veränderung des endothelialen Membranpotentials mit anschließender Calciummobilisation durch Zugabe von Statinen unterdrücken [93]. Außerdem verhindern Statine die calciumabhängige ROS Bildung und die Expression von ICAM und VCAM in HUVEC [94,95].

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Lysophosphatidylcholin zu den typischen pathophysiologischen Vorgängen der frühen Arteriosklerose führt. Auf zellulärer Ebene stellen dabei die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die Bildung radikaler Sauerstoff Spezies sowie die Induktion von ICAM und VCAM mit anschließender Monozytenadhäsion die kritischen Meilensteine einer sich entwickelnden Gefäßerkrankung dar. Es konnte gezeigt werden, dass der Calcium-aktivierte Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit bei diesen Prozessen einen regulatorischen Einfluss hat. Damit nimmt der BK_{Ca} eine entscheidende Rolle im Signaltransduktionsweg der Adhäsion und der Expression von ICAM und VCAM ein. Mit diesen Ergebnissen konnte erstmalig in der Literatur gezeigt werden, dass an der Expression von ICAM und VCAM sowie der Adhäsion von U937-Monozyten an HUVEC ein Ionenkanal beteiligt ist.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob die Lysophosphatidylcholin (LPC) induzierte Aktivierung des BK_{Ca} an der Monozytenadhäsion von U937-Zellen an humanen Nabelschnur Endothelzellen (HUVEC) beteiligt ist.

Dabei wurde der Einfluss des BK_{Ca} auf das Membranpotential mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC gemessen. Die calcium- und radikalabhängige Adhäsion wurde mit Hilfe des ³[H]-Thymidin-Adhäsions-Assays untersucht. Die calcium- und radikalabhängige Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen.

LPC induzierte eine konzentrationsabhängige Hyperpolarisation von HUVEC mit einem Maximum bei 20 µM. Weitere Konzentrationserhöhungen zeigten hierbei keinen steigernden Effekt. Deshalb wurden alle weiteren Versuche mit einer Konzentration von 20 µM durchgeführt. Der hoch spezifische BK_{Ca}-Inhibitor Iberitoxin (IBX) konnte die Hyperpolarisation verhindern (IBX, 100 nM). Dies deutet darauf hin, dass dieser Ionenkanal für die Hyperpolarisation der Zellmembran verantwortlich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von unstimulierten U937-Zellen durch Stimulation der HUVEC mit LPC verstärkt werden konnte. Dieser Effekt war zeitlich abhängig und nach t=4 Stunden gegenüber der Kontrolle signifikant. Die Stimulation von U937-Zellen führte nicht zu einer Steigerung der Adhäsion an unstimulierten HUVEC. Dies deutet darauf hin, dass die Adhäsion hauptsächlich von endothelialer Seite auszugehen scheint. Die LPC induzierte Adhäsion konnte signifikant verringert werden, wenn die HUVEC mit IBX, beziehungsweise dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Diphenyleneiodonium (DPI, 5 µM) inkubiert wurden. Ebenfalls verringerte die Hemmung der intrazellulären Calciumkonzentration durch den Calciumkanalblocker 2-amino-ethoxy-diphenyl-borate (2-APB, 100 µM) sowie den Calciumchelator BAPTA (10 µM) die LPC induzierte Adhäsion signifikant. In den FACS-Versuchen konnte LPC die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM signifikant steigern. Durch Zugabe von IBX, DPI und BAPTA wurde die Expression von ICAM und VCAM ebenfalls signifikant verringert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die zeitabhängige Adhäsion sowie die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM von der intrazellulären

Calcium- und Radikalkonzentration abhängig sind und diese vom BK_{Ca} reguliert werden.

Abstact

Aim of this study was to investigate whether LPC-induced activation of BK_{Ca} is also involved in monocyte adhesion of U937-cells to human umbilical cord endothelial cells (HUVEC). Therefore the influence of BK_{Ca} to membrane potential was measured with DiBAC-fluorencence-dye. The calcium and ROS-dependent adhesion was examined by using the $^3[H]$ -thymidine-adhesion-assay. The calcium and ROS-dependent expression of adhesion molecules ICAM and VCAM was analysed with flow-cytometry.

LPC induced a hyperpolarization of HUVEC in a dose-dependent manner with the maximum of 20 μM . Higher doses of LPC did not further enhance hyperpolarization. For this reason all following experiments were performed using a concentration of 20 μM . The highly specific BK_{Ca} -inhibitor Iberitoxin (IBX) prevented hyperpolarisation (IBX, 100 nM). This indicates that this ion channel is responsible for the hyperpolarization of the cellmembrane.

Adhesion of untreated U937 cells to HUVEC was increased after stimulation of HUVEC with LPC. This effect was time-dependent with a maximum observed after $t=4$ hours. On the other hand, stimulation of U937 cells with LPC did not cause enhancement of adhesion to unstimulated HUVEC. This indicates that the process of adhesion is mainly caused by endothelial cells. LPC-induced adhesion was significantly reduced when HUVEC were co-incubated with IBX, NADPH-oxidase inhibitor diphenyleneiodonium (DPI, 5 μM) or by addition of calcium channel-blocker 2-amino-ethoxy-diphenyl-borate (2-APB, 100 μM) or the calcium-chelator BAPTA (10 μM) to reduce intracellular calcium concentration.

In FACS analyses LPC enhanced the expression of adhesion molecules ICAM and VCAM. In Addition to LPC IBX, DPI and BAPTA significantly decreased ICAM and VCAM expression.

In conclusion the experiments demonstrate that time-dependent adhesion as well as the expression of adhesion molecules ICAM and VCAM depends on intracellular concentration of calcium and reactive oxygen species which are regulated by BK_{Ca} .

6. Literaturverzeichnis:

1. **Drenckhahn D., Zenker W.:** Benninghoff, Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, 15. Auflage; Urban & Schwarzenberg Verlag München, Wien, Baltimore (1994)
2. **Kühnel, W.:** Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. Aufl. 11,(2002)
3. **Inagami T., Naruse M., Hoover R.:** Endothelium as an endocrine Organ; Annual Reviews in Physiology 57: 171-189 (1995)
4. **Quasching T., Ruschituka F.T., Maier W., Lüscher T.F.:** Die Rolle des Endothels bei der Entstehung und Behandlung von Gefäßkrankheiten; Internist 41: 355-362 (2000)
5. **Ross R.:** Mechanisms of disease: atherosclerosis—an inflammatory disease; New Engl J Med 340: 115–26 (1999)
6. **Rubanyi G.M.:** The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease; Journal of Cardiovascular Pharmacology 22: 1-14 (1993)
7. **Furchgott R.F., Zawadzki J.V.:** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine; Nature 288 (5789): 373-376 (1980)
8. **De Meyer G.R.Y., Herman G.H.:** Vascular Endothelial Dysfunction; Progress in Cardiovascular Disease 39 (4): 325-342 (1997)
9. **Drexler H., Hornig B.:** Endothelial Dysfunction in Human Disease; Journal of Molecular Cellular Cardiology 31: 51-60 (1999)
10. **Sonoki K., Iwase M., Iino K., Ichikawa K., Ohdo S., Higuchi S., Yoshinari M., Iida M.:** Atherogenic Role of Lysophosphatidylcholine in Low-Density Lipoprotein Modified by Phospholipase A2 and in Diabetic Patients: Protection by Nitric Oxide Donor; Metabolism Vol 52, No 3: 308-314 (2003)

- 11. Sonoki K., Yoshinari M., Iwase M., Iino K., Ichikawa K., Ohdo S., Higuchi S., Iida M.:** Glycoxidized Low-Density Lipoprotein Enhances Monocyte chemoattractant Protein-1 mRNA Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells: Relation to Lysophosphatidylcholine Contents and Inhibition by Nitric Oxide Donor; *Metabolism* Vol 51, No 9 : 1135-1142 (2002)
- 12. Kume N., Cybulsky M.I., Gimbrone M.A. Jr.:** Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells; *J Clin Invest* 90(3): 1138-1144 (1992)
- 13. Sugiyama S., Kugiyama K., Ohgushi M., Fujimoto K., Yasue H.:** Lysophosphatidylcholine in oxidized low-density lipoprotein increases endothelial susceptibility to polymorphonuclear leukocyte-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. Role of protein kinase C; *Circ Res* 74(4): 565-575 (1994)
- 14. Jeng J.R., Chang C.H., Shieh S.M., Chiu H.C.:** Oxidized low-density lipoprotein enhances monocyte-endothelial cell binding against shear-stress-induced detachment; *Biochim Biophys Acta* 1178(2): 221-227 (1993)
- 15. Chen Y., Chen H., Wu L.:** Effect of lysophosphatidylcholine on endothelial cell surface expression of adhesion molecules; *J Mol Cell Cardiol* 35 (11): 1375-85 (2003)
- 16. Erl W., Weber P.C., Weber C.:** Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands; *Atherosclerosis* 136(2): 297-303 (1998).
- 17. Mine S. et al.:** Oxidized low density lipoprotein-induced LFA-1-dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway; *Atherosclerosis* 160: 281–288 (2002)
- 18. Klouche M. et al.:** Enzymatically Modified, Nonoxidized LDL Induces Selective Adhesion and Transmigration of Monocytes and T-Lymphocytes Through Human Endothelial Cell Monolayers; *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 784-793 (1999)

- 19. Aikawa M., Sugiyama S., Hill C.C., Voglic S.J., Rabkin E., Fukumoto Y., Schoen F.J., Witztum J.L., Libby P.:** Lipid Lowering Reduces Oxidative Stress and Endothelial Cell Activation in Rabbit Atheroma; *Circulation* 106:1390-1396 (2002)
- 20. Pan J.P., Cheng T.M., Chou S.C., Lai S.T.:** Vitamin C protects against lysophosphatidylcholine-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells; *J Formos Med Assoc.*102(3): 151-7 (2003)
- 21. Takahara N., Kashiwagi A., Maegawa H., Shigeta Y.:** Lysophosphatidylcholine Stimulates the Expression and Production of MCP-1 by Human Vascular Endothelial Cells; *Metabolism* Vol.145, No 5: 559-564 (1996)
- 22. Nilius B., Droogmans G.:** Ion channels and their functional role in vascular endothelium; *Physiological Reviews* 81: 1415-1459 (2001)
- 23. Himmel H., Whorton A.R., Strauss H.C.:** Intracellular Calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells; *Hypertension* 21: 112-127 (1993)
- 24. Methfessel C., Boehm G.:** The Gating of Single Calcium – Dependent Potassium Channels is Described by an Activation/Blockade Mechanism; *Biophysics of Structure and Mechanism* 9: 35-60 (1982)
- 25. Rusko J., Tanzi F., Breemen von C., Adams D.J.:** Calcium-activated-Potassium Channel in native Endothelial Cells from Rabbit Aorta: Conductance, Ca²⁺ Sensitivity and Block; *Journal of Physiology* 455: 601-621 (1992)
- 26. Vargaas F.F., Caviedas P.F., Grant D.S.:** Electrophysiological characteristics of cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells; *Microvascular Research* 47 (2): 153-165 (1994)
- 27. Bény J.:** Electrical coupling between smooth muscle cells and endothelial cells in pig coronary arteries; *Pflügers Archiv* 433: 364-367 (1997)
- 28. Latorre R., Oberhauser A., Labarca P., Alvarez O.:** Varieties of Calcium-Activated Potassium Channels; *Annual Review of Physiology* 51: 385-399 (1989)

- 29. Schreiber M., Salkoff L.:** A novel calcium sensing domain in the BK channel; Biophysical Journal 73: 1355-1363 (1997)
- 30. Maggleby K.L., Pallotta B.S.:** Calcium Dependence of Open and Shut Interval Distributions from Calcium-activated Potassium Channels in Cultured Rat Muscle; Journal of Physiology 344: 585-604 (1983)
- 31. Knaus H.G., Eberhart A., Koch R.O., Munujos P., Schmalhofer W.A., Warmke J.W., Kaczorowski G.J., Garcia M.L.:** Characterization of Tissue-expressed Alpha Subunits of the High Conductance Ca^{2+} -Activated K^{+} Channel; Journal of Biological Chemistry 270 (38): 22434-22439 (1995)
- 32. Wiecha J., Münz B.M., Wu Y., Noll T., Tillmanns H., Waldecker B.:** Blockade of Ca^{2+} -activated K^{+} Channels inhibits proliferation of human endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor; Journal of Vascular Research 35: 363- 371 (1998)
- 33. Nelson M.T., Quayle J.M.:** Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle; American Journal of Physiology 268: C799-C822 (1995)
- 34. Stoen R., Lossius K., Persson A.A., Karlsson J.O.:** Relative significance of the nitric oxide (NO)/cGMP pathway and K^{+} channel activation in endotheliumdependent vasodilation in the femoral artery of developing piglets; Acta Physiol Scand 171: 29-35 (2001)
- 35. Garcia M.L., Kaus H.G., Munujos P., Slaughter R.S., Kaczorowski G.J.:** Charybdotoxin and its Effects on Potassium Channels; American Journal of Physiology 269: C1-10 (1995)
- 36. Galvez A., Gemenez-Gallego G., Reube J.P., Roy-Contancin L., Feigenbaum R., Kaczorowski G.J., Garcia M.L.:** Purification and Characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the High Conductance Calcium-Activated-Potassium Channel from Venom of the Scorpion *Buthus Tamulus*; Journal of Biological Chemistry 265: 11083-11090 (1993)

- 37. Harvey A.L., Vatanpour H., Rowan E.G., Pinkasfeld S., Vita C., Menez A., Martin- Eauciaire M.F.:** Structure-activity studies on scorpion toxins that block potassium channels; *Toxicon* 33 (4): 425-436 (1995)
- 38. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R.:** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins; *The Journal of Clinical Investigation* Vol. 52: 2745-2756 (1973)
- 39. Bräuner T., Holser D.F., Strasser R.J.:** Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes; *Biochimica et Biophysica Acta* 771: 208-216 (1984)
- 40. Kuhlmann C.R., Lüdders D.W., Schaefer C.A., Most A.K., Backenkohler U., Neumann T., Tillmanns H., Erdogan A.:** Lysophosphatidylcholine induced modulation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels contributes to ROS dependent proliferation of cultured human endothelial cells; *J Mol Cell Cardiol* 36: 675-682 (2004)
- 41. Kuhlmann C.R.W., Schafer M., Li F., Sawamura T., Tillmanns H., Waldecker B.:** Modulation of endothelial Ca^{2+} -activated K^{+} channels by oxidized LDL and its contribution to endothelial proliferation; *Cardiovasc Res* 60: 626–34; (2003)
- 42. Kita T., Kume N., Minami M., Hayashida K., Murayama T., Sano H., Moriwaki H., Kataoka H., Nish E., Horiuchi H., Arai H., Yokode M.:** Role of oxidized LDL in atherosclerosis; *Cell Adhes Commun* 7(3): 223-31(1999)
- 43. Amberger A., Maczek C., Jurgens G., Michaelis D., Schett G., Trieb K., Eberl T., Jindal S., Xu Q., Wick G.:** Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins; *Arterioscler Thromb* 14(3): 427-33 (1994)
- 44. De Caterina R., Libby P.:** Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids; *J Dermatol Sci* 32(1): 43-54 (2003)
- 45. Dwivedi A., Änggård E., Carrier M.:** Oxidized LDL-Mediated Monocyte Adhesion to Endothelial Cells Does Not Involve NFkB; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284: 239–244 (2001)

- 46. Hsiai T.K., Cho S.K., Reddy S., Hama S., Navab M., Demer L.L., Honda H.M., Ho C.M.:** Pulsatile Flow Regulates Monocyte Adhesion to Oxidized Lipid-Induced Endothelial Cells; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1770-1776 (2001)
- 47. Erl W., Weber P.C., Weber C.:** Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands; *Atherosclerosis* 136(2): 297-303 (1998)
- 48. Frostegard J., Nilsson J., Haegerstrand A., Hamsten A., Wigzell H., Gidlund M.:** Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937; *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (3): 904-908 (1990)
- 49. Frostegard J., Wu R., Haegerstrand A., Patarroyo M., Lefvert A.K., Nilsson J.:** Mononuclear leukocytes exposed to oxidized low density lipoprotein secrete a factor that stimulates endothelial cells to express adhesion molecules; *Lipids* 31 Suppl: S57-63: (1996)
- 50. Kinard F., Jaworski K., Sergent-Engelen T., Goldstein D., Van Veldhoven P.:** Smooth Muscle Cells Influence Monocyte Response to LDL as well as Their Adhesion and Transmigration in a Coculture Model of the Arterial Wall; *J Vasc Res* 38: 479-491 (2001)
- 51. Kuhlmann C.R., Trumper J.R., Abdallah Y., Ludders D.W., Schaefer C.A., Most A.K., Backenkohler U., Neumann T., Walther S., Piper H.M., Tillmanns H., Erdogan A.:** The K⁺-channel opener NS1619 increases endothelial NO-synthesis involving p42/p44 MAP-kinase; *Thromb Haemost* 92(5): 1099-1107(2004)
- 52. Cominacini L., Pasini A., Garbin U., Evangelista S., Crea A.E., Tagliacozzi D., Nava C., Davoli A., Lo Cascio V.:** Zofenopril inhibits the expression of adhesion molecules on endothelial cells by reducing reactive oxygen species; *Am J Hypertens* 15 (10 Pt 1): 891-895 (2002)
- 53. Cominacini L., Garbin U., Pasini A.F., Davoli A., Campagnola M., Rigoni A., Tosetti L., Lo Cascio V.:** The expression of adhesion molecules on endothelial cells is inhibited by troglitazone through its antioxidant activity; *Cell Adhes Commun* 7(3): 223-231 (1999)

- 54. Cominacini L., Pasini A.F., Garbin U., Davoli A., Tosetti M.L., Campagnola M., Rigoni A., Pastorino A.M., Lo Cascio V., Sawamura T.:** Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF- κ B through an increased production of intracellular reactive oxygen species; *J Biol Chem* 275(17): 12633-12638 (2000)
- 55. Zhu Y., Lin J.H., Liao H.L., Verna L., Stemerman M.B.:** Activation of ICAM-1 promoter by lysophosphatidylcholine: possible involvement of protein tyrosine kinases; *Biochim Biophys Acta* 1345(1): 93-8 (1997)
- 56. Quinlan L., Naik S., Cannon G., Armstrong C., Bunnett N., Ansel J., Caughman W.:** Substance P Activates Coincident NF-AT- and NF- κ B -Dependent Adhesion Molecule Gene Expression in Microvascular Endothelial Cells Through Intracellular Calcium Mobilization; *The Journal of Immunology* 163: 5656–5665 (1999)
- 57. Wang Y., Wang Z., Zhoua Y., Liu L., Zhaoa Y., Yao C., Wang L., Qiao Z.:** Nicotine stimulates adhesion molecular expression via calcium influx and mitogen-activated protein kinases in human endothelial cells; *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38: 170–182 (2006)
- 58. Chen K., Chang B., Younan P., Shlykov S., Sanborn B., Chan L.:** Increased intracellular calcium transients by calmodulin antagonists differentially modulate tumor necrosis factor- α -induced E-selectin and ICAM-1 expression; *Atherosclerosis* 165: 5-13 (2002)
- 59. Allen S., Khan S., Al-Mohanna F., Batten P., Yacoub M.:** Native Low Density Lipoprotein–induced Calcium Transients Trigger VCAM-1 and E-selectin Expression in Cultured Human Vascular Endothelial Cells; *J. Clin. Invest* Vol.101, Nr 5: 1064–1075 (1998)
- 60. Theilmeier G., de Geest B., van Veldhoven P., Stengel D., Michiels C., Lox M., Landeloos M., Chapman J., Ninio E., Collen D., Himpens B., Holvoet P.:** HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice; *FASEB J* Vol. 14: 2032–2039 (2000)

- 61. Carluccio M.A., Ancora M.A., Massaro M., Carluccio M., Scoditti E., Distante A., Storelli C., De Caterina R.:** Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF- κ B and NAD(P)H oxidase activation - protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants; *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 22 (2007)
- 62. Kumar S., Sharma A., Madan B., Singhal V., Ghosh:** Isoliquiritigenin inhibits I κ B kinase activity and ROS generation to block TNF- α induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells; *Biochemical pharmacology* 73: 1602 – 1612 (2007)
- 63. Li J.M., Fan L.M., Christie M.R., Shah A.M.:** Acute Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling via NADPH Oxidase in Microvascular Endothelial Cells: Role of p47phox Phosphorylation and Binding to TRAF4; *Molecular and Cellular Biology*: 2320–2330 (2005)
- 64. Ou H.C., Chou F.P., Lin T.M., Yang C.H., Huey-Herng Sheu W.:** Protective effects of eugenol against oxidized LDL-induced cytotoxicity and adhesion molecule expression in endothelial cells; *Food and Chemical Toxicology* 44: 1485–1495 (2006)
- 65. Ross R.:** The Pathogenesis of Atherosclerosis – An Update; *New England Journal of Medicine* 314 (8): 488-500 (1986)
- 66. Ross R.:** The Pathogenesis of Atherosclerosis: A Perspective for the 1990s; *Nature* 362: 801-809 (1993)
- 67. Classen M., Diehl V., Kochsiek K.:** Innere Medizin, 5. Auflage; Urban und Fischer Verlag München (2004)
- 68. Robert-Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt:** Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Gesundheit in Deutschland; 2. Auflage (2007)
- 69. Statistisches Bundesamt:** Statistisches Jahrbuch für die Bundesrepublik Deutschland 2006; SFG Servicecenter Fachverlage (2006)

- 70. Stokes K.Y., Cooper D., Tailor A., Granger D.N.:** Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide; *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 33, No. 8: 1026–1036 (2002)
- 71. Kraml P., Syrovatka P., Stipek S., Fialova L., Koprivova H., Potockova J., Andel M.:** Hyperlipoproteinemia Impairs Endothelium-Dependent Vasodilation *Physiol Res* 53: 471-480 (2004)
- 72. Dart A.M., Chin-Dusting J.P.F.:** Lipids and the endothelium; *Cardiovascular Research* 43: 308–322 (1999)
- 73. Williams I.L., Wheatcroft S.B., Shah A.M., Kearney M.T.:** Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans; *International Journal of Obesity* 26: 754–764 (2002)
- 74. Basta G., Schmidt A.M., De Caterina R.:** Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes; *Cardiovascular Research* 63: 582– 592 (2004)
- 75. Kougias P., Chai H., Lin P.H., Lumsden A.B., Yao Q., Chen C.:** Lysophosphatidylcholine and secretory phospholipase A2 in vascular disease: Mediators of endothelial dysfunction and atherosclerosis ; *Med Sci Monit* 12(1): RA 5-16 (2006)
- 76. Vita A.J.:** Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function; *Am J Clin Nutr* 81(suppl): 292S–7S (2005)
- 77. Stein J.H., Keevil J.G., Wiebe D.A., Aeschlimann S., Folts J.D.:** Purple Grape Juice Improves Endothelial Function and Reduces the Susceptibility of LDL Cholesterol to Oxidation in Patients With Coronary Artery Disease ; *Circulation* 100: 1050-1055 (1999)
- 78. Duffy S.J., Keaney J.F., Holbrook M.Jr., Gokce N., Swerdloff P.L., Frei B., Vita J.A.:** Short- and Long-Term Black Tea Consumption Reverses Endothelial dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease; *Circulation* 104: 151-156 (2001)

- 79. Karatzi K., Papamichael C., Aznaouridis K., Karatzis E., Lekakis J., Matsouk C., Boskou G., Chiou A., Sitara M., Feliou G., Kontoyiannis D., Zampelas A., Mavrikakis M.:** Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with coronary artery disease; *Coronary Artery Disease* 15: 485–490 (2004)
- 80. Perez-Vizcaino F., Duarte J., Andriantsitohaina R.:** Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols; *Free Radic Res* 40(10): 1054-65 (2006)
- 81. Matsubara M., Hasegawa K.:** Effects of benidipine, a dihydropyridine-Ca²⁺ channel blocker, on expression of cytokine-induced adhesion molecules and chemoattractants in human aortic endothelial cells; *European Journal of Pharmacology* 498: 303– 314 (2004)
- 82. Sanada H., Midorikawa S., Yatabe J., Sasaki Yatabe S., Katoh T., Baba T., Hashimoto S., Watanabe T.:** Elevation of Serum Soluble E- and P-Selectin in Patients with Hypertension Is Reversed by Benidipine, a Long-Acting Calcium Channel Blocker; *Hypertens Res* 28: 871–878 (2005)
- 83. Nagaya N., Yamamoto H., Uematsu M., Itoh T., Nakagawa K., Miyazawa T., Kangawa K., Miyatake K.:** Green tea reverses endothelial dysfunction in healthy smokers; *Heart* 90: 1485-1486 (2004)
- 84. Frei B.:** On the role of Vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction; *P.S.E.B.M.* Vol. 222 (1999)
- 85. Cominacini L., Garbin U., Pasini A.F., Davoli A., Campagnola M., Contessi G.B., Pastorino A.M., Lo Cascio V.:** Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells; *FreeRadical Biology and Medicine* Vol. 22, Nos ½: 117-127 (1997)
- 86. van Tits L.J.H., de Waart F., Hak-Lemmers H.L.M., van Heijst P., de Graaf J., Demacker D.N.M., Stalenhoef A.F.H.:** Effects of α -Tocopherol on superoxid production and plasma intercellular adhesion molecule-1 and antibodies to oxidized

LDL in chronic smokers; Free Radical Biology & Medicine Vol. 30, No. 10: 1122–1129 (2001)

87. Sever P.S., Dahlöf B., Poulter N.R., Wedel H., Beevers G., Caulfield M., Collins R., Kjeldsen S.E., Kristinsson A., McInnes G.T., Mehlsen J., Nieminen M., O'Brien E., Östergren J., for the ASCOT investigators: Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial—Lipid lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial Lancet 361: 1149–58 (2003)

88. Collins R., Armitage J., Parish S., Sleight P., Peto R., for the Heart Protection Study Collaborative Group: MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial; Lancet 360: 7–22 (2002)

89. Martínez-González J., Badimon L.: Influence of Statin Use on Endothelial Function: From Bench to Clinics; Current Pharmaceutical Design 13: 1771-1786 (2007)

90. Davignon J., Jacob R.F., Mason R.P.: The antioxidant effects of statins; Coronary Artery Disease 15: 251–258 (2004)

91. Laufs U., La Fata V., Plutzky J., Liao J.K.: Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by HMG-CoA Reductase Inhibitors; Circulation 97: 1129-1135 (1998)

92. Inoue T., Hayashi M., Takayanagi K., Morooka S.: Lipid-lowering therapy with fluvastatin inhibits oxidative modification of low density lipoprotein and improves vascular endothelial function in hypercholesterolemic patients; Atherosclerosis 160: 369–376 (2002)

93. Yokoyama K., Ishibashi T., Ohkawara H., Kimura J., Matsuoka I., Sakamoto T., Nagata K., Sugimoto K., Sakurada S., Maruyama Y.: HMG-CoA Reductase Inhibitors Suppress Intracellular Calcium Mobilization and Membrane Current Induced by Lysophosphatidylcholine in Endothelial Cells; Circulation 105: 962-967 (2002)

- 94. Schaefer C.A., Kuhlmann C.R.W., Weiterer S., Fehsecke A., Abdallah Y., Schaefer C., Schaefer M.B., Mayer K., Tillmanns H., Erdogan A.:** Statins inhibit hypoxia-induced endothelial proliferation by preventing calcium-induced ROS formation; *Atherosclerosis* 185: 290–296 (2006)
- 95. Landsberger M., Wolff B., Jantzen F., Rosenstengel C., Vogelgesang D., Staudt A., Dahma J.B., Felix S.B.:** Cerivastatin reduces cytokine-induced surface expression of ICAM-1 via increased shedding in human endothelial cells; *Atherosclerosis* 190: 43–52 (2007)
- 96. Yeh M., Leitinger N., de Martin R., Onai N., Matsushima K., Vora D.K., Berliner J.A., Reddy S.T.:** Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF- α and oxidized phospholipids; *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:1585-1591(2001)
- 97. Kuhlmann C.:** Einfluss von oxidiertem LDL und Lysophosphatidylcholin auf den Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanal mit großer Leitfähigkeit und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Proliferation, NO- und Ca²⁺-Homöostase humaner Endothelzellen; Dissertation, VVB Laufersweiler Verlag, Wettenberg (2004)

7. Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
AGE	<i>Advanced Glycation End products</i>
2-APB	2-amino-ethoxy-diphenyl-Borate
BAPTA	1, 2-bis (2-aminophenoxy)ethane-N,N,N,N-tetraacetate
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BK _{Ca}	Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit
Ca ²⁺	Kalzium
CNP	C-type natriuretisches Peptid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DiBAC	bis-1, 3-Dibutylbarbituric acid-trimethine oxonol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPI	Di-phenylene-iodonium
EBM	<i>Endothelial Basal Medium</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
E-Selektin	<i>Endothelial Selectin</i>
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HUVEC	<i>Human Umbilical cord Vein Endothelial Cells</i>
IBX	Iberitoxin
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
K ⁺	Kalium
K _{ATP}	ATP-abhängiger Kaliumkanal
K _{Ca}	Calcium-aktivierter Kaliumkanal
K _{ir}	einwärtsgerichteter Kaliumkanal
LCAT	Lecithin-Cholesterin-acyl-Transferase
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LPC	Lysophosphatidylcholin
L-Selektin	<i>Leucocyte Selectin</i>
MAP-Kinase	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>

Abkürzungsverzeichnis

MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotid Phosphat</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	<i>oxidized Low Density Lipoprotein</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
P-Selektin	<i>Platelet Selectin</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>

8. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Marc Hartmann

9. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert

Erdogan A., Schaefer M.B., Kuhlmann C.R., Most A., Hartmann M., Mayer K., Renner F.C., Schaefer C., Abdallah Y., Hoelschermann H., Schaefer C.A.: Activation of $\text{Ca}(2+)$ -activated potassium channels is involved in lysophosphatidylcholine-induced monocyte adhesion to endothelial cells. *Atherosclerosis*; 190 (1): 100-5 (2007)

Kongressbeiträge:

1. Hartmann M., Schaefer C., Schaefer M., Fehsecke A., Most A., Renner F., Tillmanns H., Kuhlmann C., Grebe M., Erdogan A.: LPC beeinflusst die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen durch Modulation des endothelialen BK_{Ca} . 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angiologie, Berlin (2005)

2. Schaefer C.A., Schaefer M.B., Renner F., Most A.K., Hartmann M., Mayer K., Erdogan A., Kuhlmann C.R.W.: Vascular endothelial growth factor-dependent leucocyte adhesion to endothelial cells involves $\text{Ca}(2+)$ - and ROS-induced upregulation of VCAM-1 and ICAM-1. European Society of Cardiology Congress, Stockholm (2005)

3. Schaefer C.A., Kuhlmann C.R.W., Schaefer M.B., Most A.K., Hartmann M., Renner F., Schaefer C., Tillmanns H., Erdogan A.: Activation of Ca^{2+} activated K^{+} potassium channels is involved in Lysophosphatidylcholine-induced monocyte adhesion to endothelial cells. European Atherosclerosis Society Congress, Prag (2005)

4. Schaefer CA, Kuhlmann CRW, Schaefer MB, Most AK, Hartmann M, Renner F, Schaefer C, Tillmanns H, Erdogan A.: Activation of Ca^{2+} activated K^{+} potassium channels is involved in Lysophosphatidylcholine-induced monocyte adhesion to endothelial cells. Experimental Biology (FASEB) Meeting, San Diego (2005)

5. Schaefer C.A., Kuhlmann C.R.W., Schaefer M.B., Most A.K., Hartmann M., Renner F., Schaefer C., Tillmanns H., Erdogan A.: Activation of Ca^{2+} activated K^{+} potassium channels is involved in Lysophosphatidylcholine-induced monocyte adhesion to endothelial cells. 1. Deutscher Atherosklerosekongress, Leipzig (2004)

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Vorab möchte ich Herrn Prof. Dr. Harald Tillmanns und Herrn Prof. Dr. Ali Erdogan für die Möglichkeit danken, dass ich in ihrer Abteilung bzw. Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit erstellen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christian Schaefer für die vielen hilfreichen Anregungen und Gespräche bei fachlichen Problemen, die intensive Betreuung während der gesamten Durchführung dieser Arbeit und die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Bei Frau Dr. Astrid Most möchte ich mich für die theoretische und praktische Unterstützung im Radioaktivlabor sowie für die Durchsicht des Manuskriptes bedanken.

Bei Herrn Dr. Christoph Kuhlmann bedanke ich mich für die Einarbeitung in verschiedenste Labortechniken und die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ich danke insbesondere auch Herrn Prof. Dr. Lohmeyer für die Bereitstellung von Geräten und Laborräumen und Dr. Fabrice Renner für die Unterstützung bei den FACS-Versuchen.

Bei Frau Gudrun Pfeiffer und Frau Christina Frey-Krug bedanke ich mich für die Unterstützung im Labor sowie ihre Hilfe im Bereich der Zellkultur.

Darüber hinaus danke ich allen Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor und die kollegiale Zusammenarbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Sebastian Weiterer für sein Interesse und die bereichernden Diskussionen bedanken.

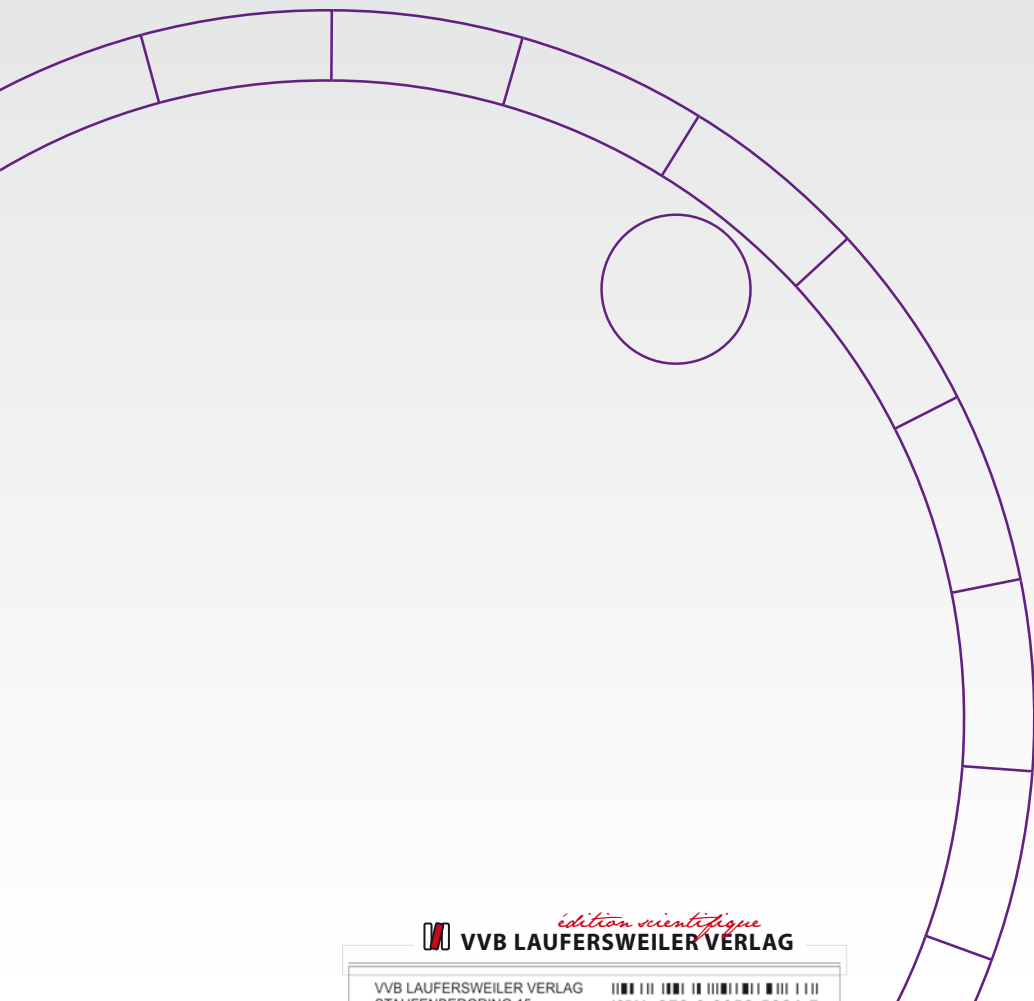
Der größte Dank gilt meinen Eltern und Großeltern für den langjährigen Rückhalt während des Studiums und die moralische Unterstützung, die mich stets in meinem Handeln und Streben bestärkt hat

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Marc Hartmann

**EINFLUSS DES CALCIUM-AKTIVIERTEN
KALIUMKANALS AUF DIE LYSOPHOSPHATIDYLCHOLIN
INDUZIERTER MONOZYTENADHÄSION AN HUMANEN
ENDOTHELZELLEN**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5806-7



9 783835 195806 7